

Immunpathogenese der Myasthenia gravis

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(dr.rer.nat.)
im Fach Biologie
eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin
von

Diplom-Biologin, Hanne Schaffert

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekanin/Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät
Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. Andreas Radbruch
2. Prof. Dr. Andreas Thiel
3. Prof. Dr. Hans-Dieter Volk

Tag der mündlichen Prüfung: 14.04.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iii
Abbildungsverzeichnis	vii
Tabellenverzeichnis	ix
1 Einleitung	1
1.1 Myasthenia Gravis	1
1.1.1 Krankheitsbild	1
1.1.2 Die Reizweiterleitung an der motorischen Endplatte bei MG	2
1.1.3 Autoantikörper	4
1.1.4 Bedeutung von CD4 ⁺ T-Zellen für die MG	5
1.1.5 Toleranzinduktion und Aufhebung	6
1.1.6 Therapie	7
1.2 Der nikotinische Azetylcholinrezeptor	8
1.2.1 Aufbau des Rezeptors	8
1.2.2 Bindungsstellen	9
1.3 EAMG Modell	10
1.3.1 Vergleich: EAMG und MG	10
1.3.2 Induktion der EAMG	11
1.4 CD4 ⁺ T-Zellen	13
1.4.1 Subpopulationen der CD4 ⁺ T-Zellen: Differenzierung und Eigen- schaften	13
1.4.2 Einfluß der Treg-Zellen auf die TH17-Zellen	15
1.4.3 Treg-Zellen in der Myasthenie	17
1.4.4 TH17-Zellen in der Myasthenie	17
1.5 Bedeutung weiterer IL17-produzierender Immunzellen für die MG	18
1.6 Zielsetzung der Arbeit	19

2	Material und Methoden	21
2.1	Biochemie	21
2.1.1	Antigene und Peptide	21
2.1.2	Proteinanalyse	25
2.2	Zellkultur	29
2.2.1	Zellzählung und Vitalitätsprüfung	29
2.2.2	Kultivierung der BC3H1 Zelllinie	29
2.3	<i>in vivo</i>	30
2.3.1	Verwendete Maus-Stämme	30
2.3.2	Induktion und klinische Evaluierung der EAMG	31
2.3.3	EMG	32
2.4	Immunologie	33
2.4.1	T-Zell Stimulation	33
2.4.2	Analyse der Durchflußzytometrie	34
2.4.3	Adoptiver CD4 ⁺ T-Zell Transfer	35
2.4.4	ELISA	36
2.5	Statistik	37
2.6	Allgemeine Labormaterialien	38
3	Ergebnisse	43
3.1	Etablierung des EAMG Mausmodells	43
3.1.1	Nachweis des <i>t</i> AChRs und des mAChRs	43
3.1.2	Erfolgreiche EAMG Induktion in WT Mäusen	44
3.1.3	Nachweis der EAMG mittels EMG	45
3.1.4	Nachweis <i>t</i> AChR-spezifischer CD4 ⁺ T-Zellen	47
3.1.5	Nachweis mAChR-spezifischer CD4 ⁺ T-Zellen	48
3.2	Analyse der Rolle von TH17-Zellen in der Pathogenese der MG	50
3.2.1	Verminderte EAMG Symptome in IL17 ^{ko} im Vergleich zu WT Mäusen	50
3.2.2	Generierung <i>t</i> AChR-spezifischer TH17-Zellen im Verlauf der Erkrankung	51
3.2.3	Vergleichbare T-Zelldifferenzierung zwischen IL17 ^{ko} und WT Mäusen	52
3.2.4	Detektion der Anti-AChR-spezifischen Antikörper bei IL17 ^{ko} im Vergleich zu WT Mäusen	56
3.3	Essentielle Rolle der TH17-Zellen für die Induktion der EAMG	57
3.3.1	Analyse des adoptiven CD4 ⁺ T-Zell-Transfers in TCR β / δ ^{ko} Mäuse	58

3.3.2	Rolle von TH17-Zellen: Analyse der, mit IL17 ^{ko} und WT CD4 ⁺ T-Zellen rekonstituierten, TCR β / δ ^{ko} Mäuse	60
3.4	Analyse der Relevanz von Treg-Zellen für die EAMG Induktion	62
3.4.1	Depletion von Treg-Zellen in DEREK Mäusen	63
3.4.2	Analoge EAMG Symptome in DEREK im Vergleich zu WT Mäusen	64
3.4.3	Vergleichbare T-Zelldifferenzierung zwischen DEREK und WT Mäusen	65
3.4.4	Detektion der AChR-spezifischen Antikörper bei DEREK im Vergleich zu WT Mäusen	66
4	Diskussion	69
4.1	Relevanz der TH17-Zellen für die EAMG	69
4.1.1	Vergleich der EAMG in IL17 ^{ko} und WT Mäusen	69
4.1.2	Vergleich der EAMG in CD4 ⁺ T-Zell-rekonstituierten, TCR β / δ ^{ko} Mäusen	72
4.2	Die Rolle von regulatorischen T-Zellen für die EAMG	77
5	Zusammenfassung	81
	Literaturverzeichnis	83
	Anhang	99
	Danksagung	105

Abkürzungsverzeichnis

<i>i.p.</i>	intraperitoneal
<i>i.v.</i>	intravenös
<i>s.c.</i>	subkutan
<i>s.m.</i>	submandibular
<i>tAChR</i>	<i>torpedo</i> Acetylcholinrezeptor
AChR	Acetylcholinrezeptor
AHR	airway hypersensitivity response
AHR	aryl-hydrocarbon-receptor
AIRE	Autoimmunregulator
Ak	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
BAC	bacterial artificial chromosome
BCA	Bicinchoninisäure
BCG	Bacille Calmette-Guérin
BSA	bovines serum albumin
CD	cluster of differentiation
CFA	complete Freund'sch adjuvans
CHS	contact hypersensitivity
cTEC	corticale Thymusepithelzellen
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
DC	dendritische Zelle
DEREG	depletion of regulatory T cell
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	doppelt negative Zelle
DP	doppelt positive Zelle
DTH	delayed-type hypersensitiviy
DTR	Diphtherie Toxin Rezeptor
EAMG	experimentelle autoimmune Myasthenia Gravis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EMG	Elektromyografie
EOMG	early-onset MG
EPP	Endplattenpotential
FCS	fetal calf serum
FoxP3	forkhead box P3
hAChR	humaner Acetylcholinrezeptor
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HLA	humanes Leukozytenantigen
HRP	horseradish peroxidase
IDO	Indoleamin 2,3-dioxygenase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iTreg	induzierte Tregs
ko	knock-out
LOMG	late-onset MG
LRP4	Lipoprotein-ähnlicher Proteinrezeptor 4
mAChR	muriner Acetylcholinrezeptor
MG	Myasthenia gravis
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MIR	main immunogenic region
mTEC	medulläre Thymusepithelzellen
MuSK	Muskel-spezifische Tyrosinkinase

NK	natürliche Killerzellen
OD	optische Dichte
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RA	Retinsäure
RATL	Rapsyn-assoziiierter transmembraner Linker
RGS	regulators of G protein signaling
ROR	receptor-related orphan receptor
RT	Raumtemperatur
SCID	schwerer kombinierter Immundefekt
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SP	einzel positive Zelle
TCR	T-Zellrezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFH	T-follikuläre Helferzelle
TGF	transforming growth factor
TH	T-Helfer
TLR	Toll-like Rezeptor
Treg	regulatorische T-Zelle
UE	Untereinheit
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

1.1	Signalübertragung an der motorischen Endplatte	2
1.2	Verlust des AChRs	4
1.3	Aufbau des nAChRs	9
1.4	Involvierte Immunzellen in die EAMG Induktion	12
1.5	Subpopulationen der CD4 ⁺ T-Zellen	14
1.6	Einfluß der Tregs auf die TH17-Zellentwicklung	15
2.1	Vakuumfiltrationsaufbau	22
2.2	EMG Messung bei der Maus	32
3.1	Silberfärbung und Western Blot des AChRs	44
3.2	EAMG Nachweis mittels EMG	46
3.3	tAChR Peptidpool Stimulationen	47
3.4	mAChR Peptidpool Stimulationen	49
3.5	Experimenteller Plan: Vergleich WT mit IL17 ^{ko} Mäusen	50
3.6	EAMG Stärke/Inzidenz beim Vergleich von WT mit IL17 ^{ko} Mäusen	51
3.7	TH17-Zellen im Verlauf der EAMG	52
3.8	tAChR-spezifische CD4 ⁺ T-Zellen in WT und IL17 ^{ko} Mäusen	53
3.9	Zytokin ⁺ CD40L ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen in WT und IL17 ^{ko} Mäusen	54
3.10	Analyse der Treg-Zellen in WT und IL17 ^{ko} Mäusen	55
3.11	Nachweis der AChR-spezifischen Antikörper in WT und IL17 ^{ko} Mäusen	56
3.12	Experimenteller Plan: Versuch mit TCR β / δ ^{ko} Mäusen	57
3.13	CD4 ⁺ T-Zellen vor dem adoptiven Transfer	58
3.14	CD4 ⁺ T-Zellen nach dem adoptiven Transfer	59
3.15	CD8 ⁺ -, NK- und γ / δ T-Zellen nach dem adoptiven Transfer	59
3.16	EAMG Stärke/Inzidenz im TCR β / δ ^{ko} Versuch	60
3.17	CD40L ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen in CD4 ⁺ T-Zell-transferierten TCR β / δ ^{ko} Mäusen	61

3.18	Zytokin ⁺ CD40L ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen in CD4 ⁺ T-Zell-transferierten TCR β / δ^{ko} Mäusen	61
3.19	Nachweis der AChR-spezifischen Antikörper in CD4 ⁺ T-Zell-transferierten TCR β / δ^{ko} Mäusen	62
3.20	Experimenteller Plan: Vergleich WT mit DEREK Mäusen	63
3.21	Depletion von Treg-Zellen in DEREK Mäusen	63
3.22	EAMG Stärke/Inzidenz beim Vergleich von WT mit DEREK Mäusen	64
3.23	<i>t</i> AChR-spezifische CD4 ⁺ T-Zellen in WT und DEREK Mäusen	65
3.24	Zytokin ⁺ CD40L ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen in WT und DEREK Mäusen	66
3.25	Nachweis der AChR-spezifischen Antikörper in WT und DEREK Mäusen	67
1	DotPlots: <i>t</i> AChR PBMC Stimulation von WT Mäusen	99
2	DotPlots: FoxP3 und Helios Färbung einer WT Maus	99
3	DotPlots: <i>t</i> AChR Stimulation von CD4 ⁺ T-Zell-transferierten TCR β / δ^{ko} Mäusen	100
4	DotPlots: <i>t</i> AChR Stimulation von WT und DEREK Mäusen	101

Tabellenverzeichnis

1.1	Immundominante Epitope auf dem hAChR	6
1.2	Sequenzvergleiche der MIR verschiedener Spezies	9
1.3	Immundominantes Epitop auf dem tAChR	10
2.1	tAChR-spezifischer Peptidpool P2	21
2.2	Puffer für die Aufreinigung des tAChRs	23
2.3	Puffer für die Gewinnung eines mAChR Lysats	25
2.4	SDS-PAGE Puffer 1	26
2.5	SDS-PAGE Puffer 2	27
2.6	Western Blot Puffer	28
2.7	Medien für die BC3H1-Zelllinie	30
2.8	Medien für die T-Zell Stimulation	34
2.9	Antikörper für die Analyse der Durchflußzytometrie	35
2.10	Antikörper für den adoptiven CD4 ⁺ T-Zell Transfer	35
2.11	ELISA-Puffer	36
2.12	Allg. Materialien: Verbrauchsmaterialien	38
2.13	Allg. Materialien: Laborgeräte	39
2.14	Allg. Materialien: Western Blot und ELISA-Antikörper	40
2.15	Allg. Materialien: Substanzen	40
2.16	Allg. Materialien: Zellkulturmedien und -zusätze	40
2.17	Allg. Materialien: Kits	41
2.18	Allg. Materialien: Software	41
3.1	Vergleich EAMG in WT und WT Kontrollmäusen	45
1	tAChR-spezifische Peptidpoole P1, P3, P4, P5	102
2	mAChR-spezifische Peptidpoole P1 - P3	103
3	mAChR-spezifische Peptidpoole P4 - P5	104

1 Einleitung

1.1 Myasthenia Gravis

Die erworbene Myasthenia gravis ist eine klassische Antikörper-vermittelte Autoimmunerkrankung, die durch eine belastungsabhängige Skelettmuskelschwäche charakterisiert ist. Die Auto-Antikörper richten sich bei 85% der Patienten gegen den nikotinischen Acetylcholinrezeptor, der auf postsynaptischer Seite lokalisiert ist [1]. Die Bindung der Anti-AChR Antikörper führt zu einer gestörten Signalübertragung an der motorischen Endplatte. Doch obwohl Auto-Antikörper die Erkrankung am Muskel vermitteln, kommt es dort weder zu einem Einstrom von Immunzellen noch zur B-Zell Expansion [2], ein Umstand der im Vergleich zu anderen Autoimmunerkrankungen besonders ist. Zur Untersuchung von Antikörper-vermittelten Autoimmunerkrankung lässt sich die MG sehr gut als Modell heranziehen, da sowohl die Identität als auch die Struktur ihres Haupt-Autoantigens, des AChRs, bekannt sind [3].

1.1.1 Krankheitsbild

Die autoimmune MG ist durch eine veränderliche Muskelschwäche gekennzeichnet, die unter Anstrengung zunimmt und sich im Ruhezustand bessert. Einflüsse wie Hitze, Infektionen oder Stress führen oft zu einer Verschlechterung der Symptome [4].

Bereits 1672 wurden erstmals charakteristische Symptome der Myasthenie beschrieben, während der Name *myasthenia gravis*, der schwere Muskelschwäche bedeutet, erst zu einem späteren Zeitpunkt geprägt wurde [5, 6].

In Abhängigkeit der betrachteten Studie und der geographischen Lokalisierung liegt die Prävalenz zwischen 3 bis 30 Erkrankungen pro 100 000 Personen [7], womit die MG zu den seltenen Erkrankungen zu zählen ist. Die Erkrankung kann in jedem Alter vorkommen, tritt jedoch gehäuft bei Frauen zwischen der zweiten und dritten und bei Männern zwischen der fünften und siebten Lebensdekade auf [1]. Bei beiden Geschlechtern gibt es eine altersabhängige bimodale Häufigkeitsverteilung [1]. Diese führt zu einer Klassifizierung in

eine früh-auftretende (EOMG) <40 Jahre und eine spät-auftretende MG (LOMG) >40 Jahre [8]. In den letzten Jahren ist die Anzahl der MG Patienten bei den LOMGs in den westlichen Ländern stetig angestiegen, als einen Grund dafür wird die verbesserte Diagnostik genannt [7] sowie eine gestiegene Lebenserwartung.

Klinisch wird zwischen der okulären (oMG) und der generalisierten Form der Myasthenie (gMG) unterschieden. Bei 2/3 aller Patienten treten zuerst okuläre Symptome wie Ptose oder das Sehen von Doppelbildern auf. Nur bei 10% der Patienten bleibt es bei der oMG. Meist kommt es zu einem Fortschreiten der Erkrankung, bei dem bulbäre Muskeln als auch die Extremitäten betroffen sein können und die schließlich eine generalisierte Form erreicht [1, 9].

Die Krankheit ist heute nur noch selten tödlich und meist nur dann, wenn es zu einer myasthenen Krise kommt, die nicht rechtzeitig behandelt wird [10]. Allerdings ist die MG noch nicht heilbar und nur in einigen Fällen kommt es zu einer vollständigen Remission [11].

1.1.2 Die Reizweiterleitung an der motorischen Endplatte bei MG

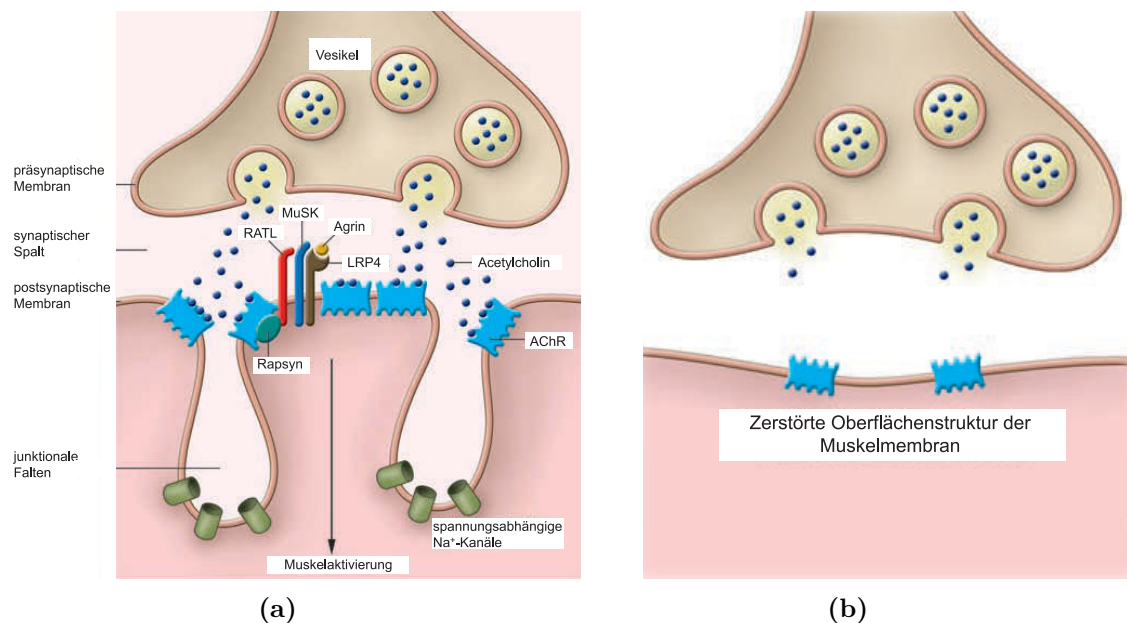


Abbildung 1.1: Modifizierte Graphiken von Conti-Fine *et al.* [9] (a) Anatomie der motorischen Endplatte. Dargestellt ist die normale Reizweiterleitung vom Nerv zum Muskel. (b) Darstellung der morphologischen Veränderungen der motorischen Endplatte bei MG.

Die motorische Endplatte besteht aus der präsynaptischen Membran, einer Nervenendigung, dem synaptischen Spalt und der postsynaptischen Membran des Muskels. Ihre Aufgabe ist es einen relativ schwachen Nervenimpuls in einen starken elektrischen Impuls umzuwandeln, der eine Muskelkontraktion erlaubt [12]. Wenn ein Aktionspotential die präsynaptische Membran erreicht, öffnen sich spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle, die die Fusion der Acetylcholin-beladenen Vesikel mit der präsynaptischen Membran triggern. [9] Dabei wird Acetylcholin in den synaptischen Spalt ausgeschüttet, das zur postsynaptischen Membran diffundiert. Ein Vesikel enthält zwischen 8000 bis 13 000 Acetylcholin Moleküle [12]. An der postsynaptischen Membran bindet Acetylcholin an den Acetylcholinrezeptor, was zu einer Öffnung des Kationenkanals und zu einem Einstrom von Na^{+} -Ionen in die Muskelfaser führt [9]. Es entsteht ein lokales Endplattenpotential (EPP), welches beim Erreichen eines Schwellenwertes ein Aktionspotential generiert, das sich entlang der Muskelfaser ausbreitet. Dabei wird Kalzium aus den internen Speichern des Muskels freigesetzt und es kommt zur Muskelkontraktion (Abb. 1.1a). Die normale postsynaptische Membran des Muskels ist gekennzeichnet durch junktionale Falten, an deren Spitzen die Konzentration der Acetylcholinrezeptoren am höchsten ist. Zur strukturellen Unterstützung des AChR Clusterings dienen weitere Moleküle auf der postsynaptischen Seite. Dazu zählen MuSK, Agrin, RATL, LRP4 und Rapsyn [9]. Bspw. versterben $\text{MuSK}^{-/-}$ Mäuse bereits bei Geburt, da MuSK wichtig für die Ausbildung der neuromuskulären Synapse zu sein scheint [13].

Die Veränderungen an der neuromuskulären Synapse bei MG betreffen sowohl die Anatomie als auch die Physiologie (Abb. 1.1b). Durch pathogene Antikörper kommt es zum Abbau des AChR, was zur Abflachung der junktionalen Falten auf postsynaptischer Seite führt und schließlich zur Störung der Signalübertragung [14]. Das EPP der normalen motorischen Endplatte ist größer als der zu erreichende Schwellenwert, der für die Generierung eines Aktionspotential von Nöten ist. Diese Differenz wird als "Sicherheitsfaktor" bezeichnet. In MG Patienten ist das EPP aufgrund einer reduzierten Anzahl und Aktivität von AChR Molekülen geringer. Deshalb reicht das EPP im Ruhezustand des MG Patienten zum Auslösen eines Aktionspotentials, jedoch nicht bei wiederholter Anstrengung [9].

Zum Verlust der Anzahl und Funktion der AChRs kann es durch drei Mechanismen kommen. Die Bindung von pathogenen Antikörpern kann in der Komplement-aktivierten Zerstörung des Rezeptors und der Oberflächenstruktur der Muskelmembran resultieren (Abb. 1.2a). Außerdem können die Anti-AChR Antikörper zur Kreuzvernetzung von be-

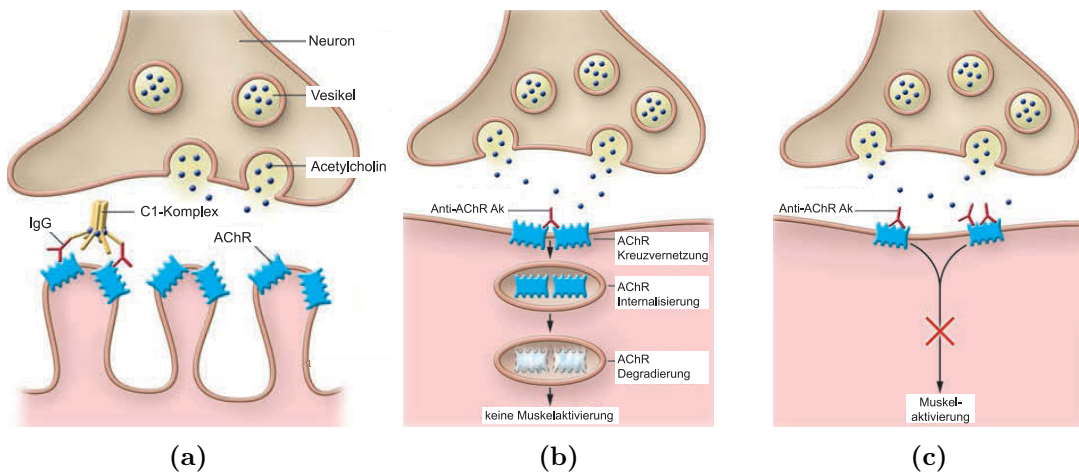


Abbildung 1.2: Modifizierte Graphiken von Conti-Fine *et al.* [9] zum Verlust des AChRs durch Autoantikörper, die zu (a) Komplement-aktiverter Zerstörung, (b) Antigenmodulation und (c) Blockierung der Acetylcholin-Bindungsstelle führen.

nachbarten AChR Molekülen beitragen, die zu einer beschleunigten Internalisierung und Abbau des AChRs führen, ein Prozess, der auch als Antigenmodulation bezeichnet wird (Abb. 1.2b) und die Blockierung der Acetylcholin-Bindungsstelle durch Anti-AChR Antikörper kann zum Funktionsverlust des Rezeptors führen (Abb. 1.2c) [9, 14].

1.1.3 Autoantikörper

Bei der erworbenen MG handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung, die durch Auto-Antikörper vermittelt wird. Dafür sprechen folgende Beobachtungen: in einer Studie von Toyka *et al.* konnte gezeigt werden, dass eine Übertragung der MG mittels Patienten-Serum von Menschen auf Mäuse möglich ist [15], weiterhin führt eine Plasmapherese, also der Austausch des Blutplasmas, zu einer Verbesserung der Krankheitssymptomatik bei MG Patienten [16] und es besteht eine intraindividuelle Korrelation zwischen dem Antikörpertiter und dem Schweregrad der Erkrankung [17].

Die Antikörper richten sich wie bereits beschrieben zu 85% gegen den AChR [1] und am Rezeptor hauptsächlich gegen die MIR, die auf extrazellulärer Seite der α -Untereinheit lokalisiert ist [18, 19]. Außerdem gehören die Anti-AChR Antikörper größtenteils den IgG Subklassen 1 und 3 an [20], die für ihre Komplement-aktivierenden Eigenschaften bekannt sind.

Jedoch sind nicht alle MG Patienten seropositiv für Anti-AChR Antikörper. Etwa 70%

der als seronegativ bezeichneten Patienten, besitzen Antikörper gegen MuSK. Die im Gegensatz zu Anti-AChR Antikörpern vor allem der Klasse der IgG4 Antikörper angehören [21, 22]. MuSK ist ein transmembranes Protein, das sich auf der postsynaptischen Seite der neuromuskulären Synapse befindet. Zusammen mit LRP4 dient es als Rezeptor für Agrin, ein von Motoneuronen synthetisiertes Protein, welches zur Aktivierung von MuSK und damit zur Aggregation der Acetylcholinrezeptoren führt [23]. Außerdem wurde kürzlich noch ein weiteres Autoantigen, das LRP4, in doppelt-seronegativen Patienten detektiert [24–26]. Die Anti-LRP4 Antikörper gehören zur IgG1 Subklasse [24].

Allein anhand der Verschiedenheit der Autoantikörper, ihrer Spezifitäten, der IgG Subklassen sowie der unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen im Serum und im Gewebe lässt sich wohl erklären [14], dass der Anti-AChR Antikörpertiter nicht interindividuell mit der Ausprägung der Myasthenie korreliert [27], sondern nur intraindividuell [17]. Ausschließlich Masuda *et al.* konnte eine interindividuelle Korrelation mit der Schwere der Erkrankung beobachten, durch die Fokussierung auf Autoantikörper gegen den AChR, die nur die MIR binden [28].

1.1.4 Bedeutung von CD4⁺ T-Zellen für die MG

Obwohl es sich bei der MG um eine B-Zellen abhängige Erkrankung handelt, aufgrund von Autoantikörper produzierenden Plasmazellen, spielen auch T-Zellen eine essentielle Rolle für das Krankheitsgeschehen. Dieser Sachverhalt lässt sich durch eine Reihe von Hinweisen belegen: so bewirkte die Entnahme des Thymus [29], die Gabe von anti-CD4 Antikörpern [30] und der Verlust von CD4⁺ T-Zellen aufgrund von HIV [31], eine Verbesserung von myasthenen Symptomen. Weiterhin führte der adoptive Transfer von huPBMCs in SCID Mäusen, in einer Studie von Wang *et al.*, zur Synthese von humanen Anti-AChR Antikörpern und zur Induktion von MG Symptomen [32], wenn dieser Transfer CD4⁺ T-Zellen enthielt.

Damit es zur Aktivierung von B-Zellen und damit auch zur Differenzierung in Antikörper-sezernierende Plasmazellen kommt, bedarf es der Hilfe von aktivierten T-Zellen und der Bindung des Antigens durch den B-Zell-Rezeptor. CD4⁺ T-Zellen, die gegen den AChR reagieren, konnten *in vitro* sowohl bei Patienten mit einer oMG als auch bei denen mit einer gMG nachgewiesen werden. Außerdem wurde gezeigt, dass sich die Immunantwort bei der generalisierten Form der MG gegen alle AChR-UE richtet und deren Epitop Repertoire mit dem Fortschreiten der Erkrankung zunimmt [33, 34]. Jedoch gibt es einige wenige immundominante Sequenzen des AChRs, die unabhängig vom MHC Typ des MG

Immundominante Epitope	Amminosäuresequenzen
α 48-67	QIVTTNVRLKQQWVDYNLKW
α 101-120	AIVKFTKVLLQYTGHITWTP
α 118-137	WTPPAIFKSYCEIIVTHFPF
α 304-322	STHVMPNWVRKVFIDTIPN
α 403-437	AMVMDHILLGVFMLVCIIGTLAVFAGRLIELNQQG

Tabelle 1.1: Immundominante T-Zell Epitope auf der α -Untereinheit des hAChRs bei MG Patienten.

Patienten von den meisten $CD4^+$ T-Zellen erkannt werden [35, 36] (Tab.1.1). Die Mehrheit dieser Epitope befinden sich auf der α -Untereinheit des hAChRs, jedoch gibt es auch je zwei immundominante Sequenzen auf der β -, γ - und δ -Untereinheit [36].

Das AChR-spezifische $CD4^+$ T-Zellen sowohl in MG Patienten als auch in normalen Individuen gefunden wurden, zeigt welche Bedeutung einer funktionierenden Immunregulation zur Erhaltung der Toleranz zukommt [37]. Da bei >80% der gMG Patienten, die positiv für Autoantikörper gegen den AChR getestet sind, pathologische Veränderungen des Thymus auftreten, scheint jedoch gerade die Stelle für die zentrale Toleranzinduktion in die Krankheitsentwicklung involviert zu sein [8].

1.1.5 Toleranzinduktion und Aufhebung

Eine Toleranz gegenüber körpereigener Strukturen entsteht vor allem in den primären lymphatischen Organen, durch das Aussortieren autoreaktiver T- und B-Zellen aus dem Pool funktionaler Immunzellen, die in die Peripherie entlassen werden. Während die Toleranzinduktion der T-Zellen im Thymus erfolgt, findet die Toleranzinduktion der B-Zellen im Knochenmark statt. In die Erhaltung der Toleranz sind in der Peripherie zusätzlich regulatorische Immunzellen involviert [38]. Ein Versagen dieser Toleranzmechanismen kann zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen führen, allerdings können auch entzündliche Prozesse, molekulare Mimikry, Impfungen, Umweltfaktoren oder genetische Prädisposition die Selbst-Toleranz beeinflussen [23]. So exprimieren MG Patienten einige MHC Allele mit einer vergleichsweise höheren Frequenz als diese in der Bevölkerung normalerweise auftreten. Dazu zählen das B8 sowie A1 Klasse I Molekül, das DR3/DW3 Klasse II Molekül und bestimmte DQ Allele [9].

Im Fall der MG, die durch Anti-AChR Antikörper hervorgerufen wird, spricht einiges für eine Beteiligung des Thymus an der Krankheitsentstehung, da eine Entnahme des Thy-

mus häufig zu einer Verbesserung der MG Symptome führt [29] und viele MG Patienten sowohl morphologische als auch funktionale Abnormalitäten des Thymus aufweisen. Etwa 10-20% der MG Patienten leiden an einem Thymom, einem epithelialer Tumor des Thymus, während 50-60% eine Hyperplasie des Thymus aufweisen [39]. Die Thymome werden aufgrund ihres Gehaltes an Lymphozyten und der Form ihrer Epithelzellen histologisch in verschiedenen Subtypen unterteilt [40]. Im Allgemeinen handelt es sich um neoplastische TECs mit corticalen als auch medullären Eigenschaften, die sich oft durch reduzierte Level an HLA-II und AIRE [40] sowie durch eine erhöhte Produktion reifer T-Zellen [41] auszeichnen. Hyperplasien finden sich vor allem bei EOMG Patienten [39], bei denen konnten im Thymus sowohl lymphoide Follikel als auch B-Zell-Keimzentren nachgewiesen werden, die zudem in unmittelbarer Nähe zu myoiden Zellen vorlagen [42]. Die Keimzentren fördern die somatische Hypermutation der B-Zell-Rezeptor Gene sowie die Produktion von Anti-AChR Antikörpern. Außerdem sind im Thymus lokalisierte myoide Zellen in der Lage den vollständigen AChR zu exprimieren [40], ähnlich der mTECs, die AIRE-abhängig Teile des AChRs exprimieren. Sowohl myoide Zellen als auch mTECs bilden damit eine mögliche Quelle für das Autoantigen AChR. Deshalb wird vermutet, dass die myoiden Zellen, aber auch die mTECs an der Initiierung und Erhaltung der Autoimmunreaktion gegen den AChR beteiligt sind. Jedoch sind die zugrundeliegenden Mechanismen bisher nicht bekannt [39].

Das Tiermodell der MG weist normalerweise keine Veränderungen des Thymus auf [43], jedoch ließ sich in einer Studie von Schönbeck *et al.* die MG auf SCID Mäuse übertragen, durch die Transplantation von Thymusgewebe von MG Patienten [44]. Eine Beobachtung die ebenfalls für eine Rolle des Thymus oder der im Thymus reifenden T-Zellen bei der Entwicklung der MG spricht.

1.1.6 Therapie

Zur Behandlung der MG werden verschiedene Therapieoptionen angewendet, in Abhängigkeit von der Schwere der Erkrankung und vom Alter der Patienten. Acetylcholinesterase-Hemmer kommen in der Primärtherapie zum Einsatz. Diese bewirken eine temporäre Verbesserung der Symptome, durch eine Erhöhung des frei verfügbaren Acetylcholin an der neuromuskulären Synapse. Ebenfalls häufig ergänzend verwendet werden immunmodulatorische Pharmaka wie Corticosteroide, Azathioprine oder Rituximab. Diese Medikamente werden meist über Jahre verabreicht und führen letztendlich zu einer Verringerung der Auto-Antikörper. Um eine schnelle allerdings kurzfristige Verbesserung der MG zu errei-

chen, können intravenös Immunglobuline gegeben werden oder es wird eine Plasmapherese vorgenommen. Die Plasmapherese kann unspezifisch als Austausch des kompletten Blutplasmas oder spezifisch als Immunadsorption durchgeführt werden. Diese Möglichkeiten werden im allgemeinen zur Behandlung einer myasthenen Krise oder in Vorbereitung einer Operation genutzt. Weiterhin wird die Thymektomie zur MG Therapie verwendet, meist früh im Krankheitsverlauf und bei Patienten unter 60 Jahren mit Antikörpern gegen den AChR [4, 9]. In 57% der MG Fälle kommt es zu einer generellen Verbesserung der Erkrankung und in 13% zu einer Remission durch die gegebenen therapeutischen Möglichkeiten nach den ersten zwei Jahren [4]. Bisher gibt es jedoch keine Behandlungsoption die spezifisch die MG therapiert bzw. die Immuntoleranz wieder herstellt.

1.2 Der nikotinische Azetylcholinrezeptor

Der muskuläre nAChR gehört zu einer Familie pentamerer Transmitter-gesteuerter Ionenkanäle, zu denen auch neuronale AChRs, GABA_A Rezeptoren, 5 – HT₃ Rezeptoren und Glycin-Rezeptoren zählen [45]. Er ist benannt nach seinem Agonisten Nikotin. Eine Bindung eines seiner Agonisten, führt zur Öffnung des Ionenkanals und trägt somit zur Signaltransduktion an der neuromuskulären Synapse bei [46]. Der nAChR ist das Haupt-Autoantigen der erworbenen MG.

1.2.1 Aufbau des Rezeptors

Zur Aufklärung der Struktur des AChRs und der ablaufenden Mechanismen am AChR wurden im Wesentlichen Modelle verwendet, die vor allem der α -Untereinheit des Rezeptors ähneln und fast alle konservierten Regionen besitzen [46, 48]. Der muskuläre nAChR ist ein Heteropentamer bestehend aus fünf homologen Untereinheiten: zwei α -, eine β -, eine γ - und eine δ - Untereinheit. Der AChR hat etwa 80 Å im Durchmesser und 120 Å in der Länge [49]. Es gibt eine fetale und eine reife Form des AChRs. Anstelle der γ -Untereinheit besitzt die fetale Form eine ϵ -Untereinheit [49]. Jede dieser Untereinheiten setzt sich aus einer großen extrazellulären Domäne, vier transmembranen Helices (M1-M4) und einer kleinen intrazellulären Domäne zusammen [48]. Es gibt zwei Bindungsstellen für den Neurotransmitter Acetylcholin, die sich zwischen der α - und der γ - sowie der α - und der δ -Untereinheit befinden [48] (Abb.1.3). Ein Vergleich der Untereinheiten des AChRs verschiedener Spezies zeigt einen hohen Grad an Sequenzhomologie. Diese ist mit etwa 80% beim Vergleich der α -Untereinheiten zwischen dem humanen muskulären AChR und

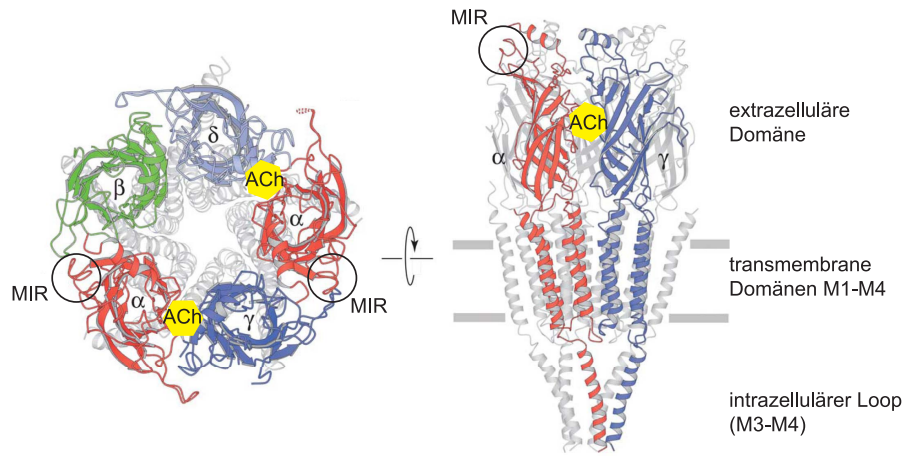


Abbildung 1.3: Struktureller Aufbau des *tAChRs*. Links: die Aufsicht auf den Rezeptor von extrazellulärer Seite. Dargestellt sind die fünf Untereinheiten sowie die Acetylcholin-Bindungsstelle als auch die Position der MIR. Rechts: Ansicht von der Seite, Die Zellmembran ist charakterisiert durch die grauen Balken. Zusätzlich zur linken Graphik sind die transmembranen Domänen M1-M4 sowie der cytoplasmatische Teil des AChRs zu erkennen. Modifizierte Graphiken von Unwin [45] und Lazaridis *et al.* [47]

dem *tAChR* besonders hoch. Insgesamt ist die α -Untereinheit die am stärksten konservierte AChR Untereinheit [18].

1.2.2 Bindungsstellen

Die extrazelluläre Domäne ist die Hauptbindungsstelle für Autoantikörper, Agonisten und Antagonisten wie α -Bungarotoxin, Cobratoxin und andere Toxine, die sehr wirksam den nAChR inhibieren können [48]. α -Bungarotoxin bindet mit hoher Affinität an oder

Spezies	MIR ^{67–76}
Mensch (<i>h. sapiens</i>)	WNPDDYGGVK
Maus (<i>m. musculus</i>)	WNPDDYGGVK
Zitterrochen (<i>t. californica</i>)	WNPADYGGIK

Tabelle 1.2: Amminosäure-Sequenzvergleiche der MIR verschiedener Spezies

in der Nähe der beiden Acetylcholin-Bindungsstellen [18]. Während sich etwa die Hälfte aller MG Autoantikörper gegen die MIR richten, die auf der α -Untereinheit lokalisiert ist (Tab.1.2). Die α -Untereinheit dominiert die Immunantwort gegen den AChR nicht nur auf Antikörper-Ebene, sondern auch auf T-Zell Ebene [49].

1.3 EAMG Modell

Zur Untersuchung der Pathomechanismen, die der MG zu Grunde liegen sowie zur Erforschung neuer Therapieoptionen wird das als EAMG bezeichnete MG Tiermodell herangezogen. In Abhängigkeit von der verwendeten Tierart wird die Myasthenie durch einmalige oder wiederholte Immunisierungen, mit dem nativen AChR Molekül und einem Adjuvans, hervorgerufen. Der AChR kann von verschiedenen Spezies sein, da die konservierte AChR Struktur interspezies-Kreuzreaktionen der Anti-AChR Antikörper erlaubt [3]. Am häufigsten wird der *tAChR* zur EAMG Induktion verwendet, da dieser sich leicht aus dem elektrischen Gewebe des Zitterrochens *torpedo californica* aufreinigen lässt [36].

1.3.1 Vergleich: EAMG und MG

Die EAMG in der Maus ähnelt in ihren klinischen, pathologischen und elektrophysiologischen Charakteristika der MG - so zeichnen sich beide durch eine gegen den AChR gerichtete Antikörper-vermittelte Muskelschwäche aus [50, 51]. Die Spezifitäten der Anti-AChR Antikörper sind im Wesentlichen gleich. Sie richten sich hauptsächlich gegen einen bestimmten Bereich auf der α -Untereinheit des Rezeptors: der MIR (Tab.1.2) [18, 28, 52]. In der MG als auch in der EAMG sind $CD4^+$ T-Zellen notwendig für die Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen in Antikörper-sezernierende Plasmazellen. Außerdem sind sowohl bei der MG als auch bei der EAMG MHC Klasse II Allele mit der Erkrankung assoziiert [51]. Die $CD4^+$ T-Zellen erkennen ähnlich wie die Autoantikörper spezifisch bestimmte immundominante Abschnitte auf dem Rezeptor. Während bei MG Patienten mehrere immundominante Epitope vorkommen (Tab.1.1), sind die meisten $CD4^+$ T-Zellen in der EAMG gegen eine Epitop Sequenz auf der α -Untereinheit gerichtet (Tab.1.3). Jedoch kreuzreagieren diese pathogenen $CD4^+$ T-Zellen in der EAMG nicht oder nur geringfügig mit murinen AChR Sequenzen [3].

Immundominantes Epitop	Amminosäuresequenzen
α 146-162	LGIWTYDGTKVISIPES

Tabelle 1.3: Immundominantes T-Zell Epitop auf dem *tAChR* im EAMG Mausmodell.

Bei der MG und EAMG kommt es zur Ablagerung von IgGs und C3 Komplement Komponenten an der neuromuskulären Synapse, die zur Bildung eines Membranangriffskomplexes in der Plasmamembran führen [53, 54].

Die Gabe von Acetylcholinesterase Inhibitoren führt in beiden Fällen zu einer Verbesse-

rung der Symptome, außerdem ist auch in der Maus nach EAMG Induktion die Messung eines sogenannten Dekrementes nach wiederholter Nerv-Stimulation möglich [12, 55]. Die Hauptursache für die Muskelschwäche ist, sowohl bei der MG als auch bei der EAMG, der Verlust des muskulären nAChRs [51].

Es gibt viele Gemeinsamkeiten zwischen der EAMG und der Myasthenie, jedoch auch einige wichtige Unterschiede. Während die EAMG durch die Injektion des *tAChRs* in Adjuvans ausgelöst wird, ist der Trigger, der die Erkrankung beim Menschen hervorruft und aufrechterhält, bisher unbekannt. Viele Studien weisen auf eine Beteiligung des Thymus hin [39, 50], da der Thymus von MG Patienten häufig funktionale und morphologische Veränderungen aufweist. Jedoch konnten im Mausmodell bis jetzt keine Veränderungen des Thymus nachgewiesen werden [51]. Ein weiterer Unterschied beruht auf der Beobachtung, dass die mit *tAChR* immunisierten Mäuse keine okuläre MG entwickeln im Gegensatz zu Myasthenie Patienten, bei denen Ptosis als auch das Sehen von Doppelbildern häufig zu den ersten Symptomen zählt [50]. Eine Ausnahme bildet eine spezielle Immunisierungsvariante. In verschiedenen Mauslinien ließ sich eine rein okuläre Form der EAMG induzieren durch die Immunisierung mit einem *Escherichia coli* Plasmid, der rekombinant die α - oder γ -Untereinheit des humanen AChRs exprimiert [50, 56].

1.3.2 Induktion der EAMG

Die Induktion der EAMG basiert auf ähnlichen Mechanismen, die auch für Schutzimpfungen gegen verschiedene Pathogene postuliert werden. Die Immunisierung mit dem *tAChR*-Adjuvans Gemisch erfolgt subkutan, wobei als Adjuvans im allgemeinen CFA zum Einsatz kommt, das ausschließlich im Tierversuch verwendet wird. CFA ist eine Öl-in-Wasser Emulsion, die Hitze-abgetötete Mykobakterien enthält und verstärkend auf die Immunogenität des *tAChR* wirkt. Die Bakterien Bestandteile können von TLRs gebunden werden und induzieren auf diesem Wege die Produktion verschiedener inflammatorischer Zytokine. Der dadurch entstehende lokale Entzündungsherd führt zu einer verstärkten Immunreaktion. Zusätzlich bewirkt die Öl-in-Wasser Emulsion sowohl eine verlängerte Lebensdauer als auch eine verbesserte Aufnahme des Antigens [57].

Zur Auslösung der Immunantwort gegen den aufgereinigten *tAChR* bedarf es zuerst der Aufnahme, Prozessierung und Präsentation des Antigens durch professionelle APCs. Die Antigenpräsentation erfolgt im Fall der $CD4^+$ T-Zellen über MHC Klasse II Moleküle. Für das Priming der naiven $CD4^+$ T-Zelle sind drei Hauptsignale von Bedeutung. Das erste Signal beinhaltet die Wechselwirkung des TCRs mit dem MHC-Peptid Komplex der

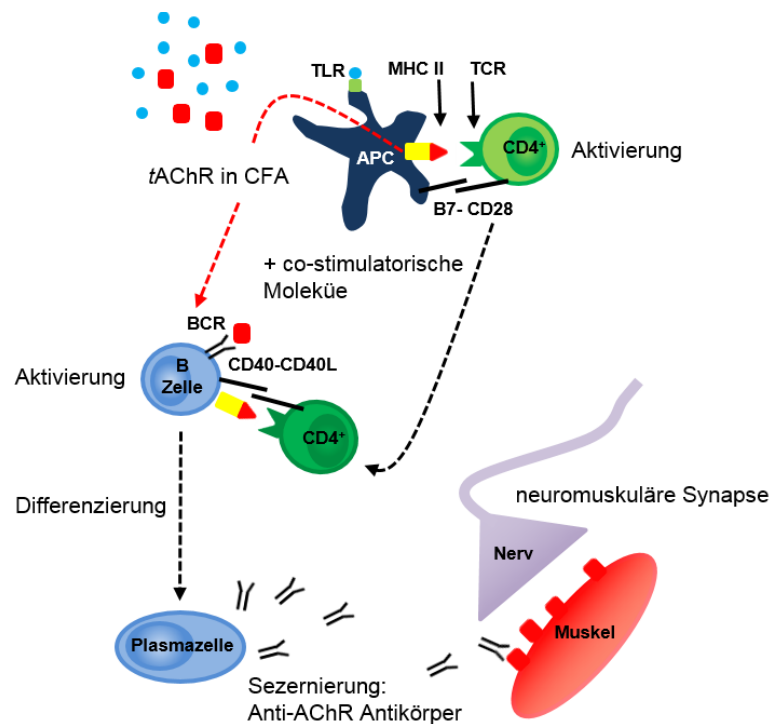


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der EAMG Induktion. Zur Auslösung einer Immunantwort gegen den muskulären nAChR wird den Versuchstieren subkutan ein tAChR-CFA Gemisch injiziert. Dieses führt zur Aktivierung spezifischer $CD4^+$ T-Zellen durch professionelle APCs. Die aktivierten $CD4^+$ T-Zellen sind wiederum in der Lage, spezifisch B-Zellen zu aktivieren sowie deren Differenzierung in Anti-AChR-Antikörper sezernierende Plasmazellen zu triggern. Durch die Autoantikörper-Bindung kommt es an der motorischen Endplatte zu einem Verlust der AChR-Moleküle und damit zu einer gestörten Reizweiterleitung, der erste Symptome der Myasthenie folgen.

dendritischen Zelle - einer professionellen APC. Es ist essentiell für die Aktivierung der $CD4^+$ T-Zelle. Jedoch benötigt die Zelle ein weiteres Signal, das ihr Überleben sichert und zur Proliferation führt. Dieses zweite Signal betrifft die Interaktion Co-stimulatorischer Moleküle wie der B7-Moleküle mit CD28. Das dritte Signal bezieht sich auf die Zytokinsekretion der APCs und kann in Abhängigkeit der ausgeschütteten Zytokine zur Differenzierung in eine der $CD4^+$ T-Zell Subpopulationen führen.

Die aktivierte $CD4^+$ T-Zelle ist schließlich in der Lage ihrerseits B-Zellen zu aktivieren, die dasselbe Antigen erkennen. Dafür muss die B-Zelle das Antigen über ihren BCR binden und schließlich über MHC Klasse II Moleküle präsentieren. Die spezifische Wechselwirkung zwischen der B-Zelle und der $CD4^+$ T-Zelle führt zur Expression des Moleküls CD40L

auf der Oberfläche der CD4⁺ T-Zelle und zur Freisetzung B-Zell stimulierender Zytokine wie IL4 und IL5. Diese führen zur Proliferation und schließlich zur Differenzierung in antikörpersezernierende Plasmazellen [38].

Im Fall der EAMG sezernieren die Plasmazellen Antikörper gegen den AChR, die an der neuromuskulären Synapse ihre pathogene Wirkung entfalten (Abb.1.4). Die Bindung der Anti-AChR Antikörper führt entweder zum Abbau oder zum Funktionsverlust des Rezeptors. In jedem Fall kommt es zu einer gestörten Signaltransduktion und einer damit verbundenen belastungsabhängigen Muskelschwäche.

1.4 CD4⁺ T-Zellen

CD4⁺ T-Zellen gehören zum adaptiven Immunsystem. Die Besonderheiten des adaptiven Immunsystems sind deren Anpassungsmöglichkeiten an sich verändernde Pathogene, durch die Diversität ihrer Rezeptoren und die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses.

1.4.1 Subpopulationen der CD4⁺ T-Zellen: Differenzierung und Eigenschaften

Die Differenzierung der CD4⁺ T-Zellen in verschiedene Subpopulationen ist wichtig für ihre Funktion bei der Immunabwehr und -regulation [58, 59]. Zu den bisher identifizierten Untergruppen, die sich in Abhängigkeit des Zytokinmilieus generieren lassen, gehören hauptsächlich TH1, TH2, TFH, iTreg und TH17-Zellen. TH1-Zellen brauchen IFN γ und IL12 zur Differenzierung ihres Phänotyps, während TH2-Zellen IL4, TFH-Zellen IL21, iTregs TGF β und TH17-Zellen TGF β sowie IL6 benötigen. Ihre Charakterisierung erfolgt in erster Linie anhand ihres Zytokinprofils, aber auch durch die, an der Zytokinexpression beteiligten, Transkriptionsfaktoren (Abb.1.5). Zytokine spielen sowohl bei der Differenzierung als auch bei der Charakterisierung eine Rolle - von besonderer Bedeutung sind sie jedoch für die Effektorfunktion der jeweiligen TH-Zelle [38, 60].

TH1-Zellen produzieren IFN γ , das zur Aktivierung von Phagozyten beiträgt und damit die Abwehr intrazellulärer Pathogene begünstigt. Außerdem führt IFN γ zum Isotypenwechsel in Richtung bestimmter IgGs und inhibiert die TH2 und TH17 Differenzierungswege [38, 60]. TH2-Zellen können mithilfe ihrer sezernierten Zytokine sowohl einen Klassenwechsel hin zu IgG, IgA als auch IgE Molekülen bewirken. Aus diesem Grund sind die TH2-Zellen am Schutz vor extrazellulären Erregern beteiligt, aber über IgE auch an all-

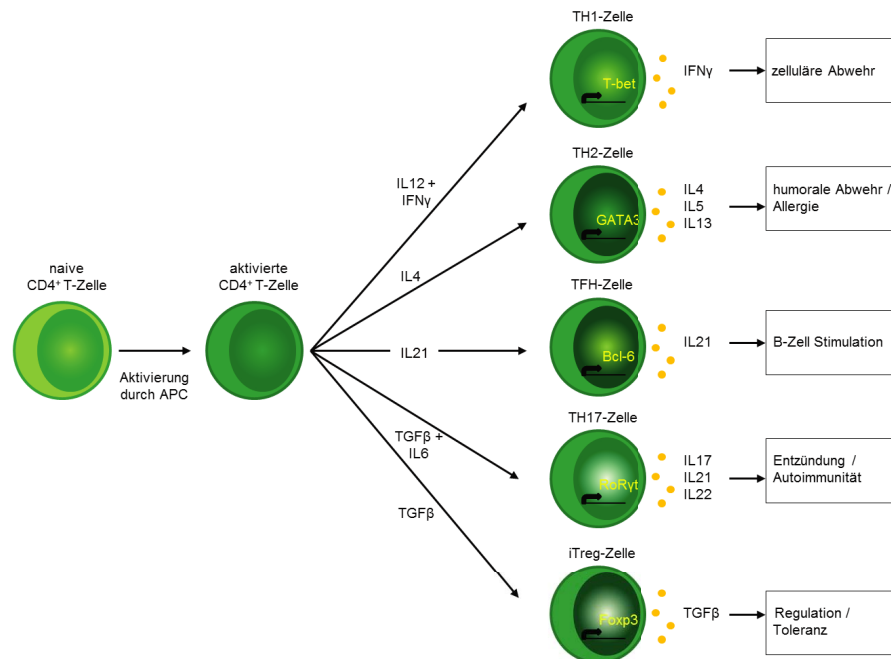


Abbildung 1.5: Schema der CD4⁺ T-Zelldifferenzierung. Nach Aktivierung können sich die CD4⁺ T-Zellen in Abhängigkeit bestimmter Polarisierungszytokine in unterschiedliche TH-Effektorzellen differenzieren: TH1, TH2, TFH, TH17 und iTreg. Diese CD4⁺ Subpopulationen sekretieren wiederum verschiedene Zytokine und besitzen eine spezifische Funktion im Immunsystem. Veränderte Graphik von Dong [61].

ergischen Reaktionen. Das von ihnen produzierte Zytokin IL4 hemmt den TH1 und TH17 Phänotyp [38, 60]. TFH-Zellen sind hauptsächlich in die B-Zell Hilfe involviert. Die Expression von CXCR5, in Verbindung mit einer Herunterregulierung von CCR7, ermöglicht ihre Migration in die B-Zell Follikel und Keimzentren. Dort vermitteln die TFH-Zellen mithilfe von IL21 die B-Zell-Proliferation und -Differenzierung [62–64]. Treg-Zellen sind an der Toleranzerhaltung beteiligt durch die Ausschüttung immunsuppressiver Moleküle wie TGF β oder IL10. Außerdem können Treg-Zellen über die Manipulation von DCs mithilfe des CTLA-4 Oberflächenmoleküls sowie über den Verbrauch an IL2, das die T-Zellen zum Überleben benötigen, auf die Effektor-T-Zellen Einfluß nehmen [65–67]. Die Entwicklung von iTregs und TH17-Zellen ist eng miteinander verknüpft. Beide benötigen TGF β für ihre Differenzierung. Das Zytokin IL6, das TH17-Zellen darüber hinaus brauchen, inhibiert wiederum den iTreg-Phänotyp [65]. TH17-Zellen sekretieren IL17 und IL17F, IL22 und IL21, außerdem benötigen sie IL23 als Wachstums- bzw. Stabilisierungsfaktor [68]. In der Immunabwehr spielen sie eine wichtige Rolle durch ihre Fähigkeit der Rekrutierung

neutrophiler Granulozyten und Makrophagen in infiziertes Gewebe [61]. Doch im Unterschied zu Tregs werden TH17-Zellen in erster Linie mit Entzündungsreaktionen und der Pathogenese von verschiedenen Autoimmunerkrankungen assoziiert [68].

1.4.2 Einfluß der Treg-Zellen auf die TH17-Zellen

Die TH17- und Treg-Zellen spielen eine gegensätzliche Rolle bei der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen. Während die TH17-Zellen diese eher begünstigen, sind die Treg-Zellen, die sich aus den nTregs und iTregs zusammensetzen, ein wesentlicher Bestandteil bei der Erhaltung der peripheren Toleranz und Immunhomöostase. Sie verfügen dabei über verschiedene Mechanismen zur Unterdrückung unerwünschter Immunreaktionen. Auf die TH17-Zellen können sie sowohl direkt als auch indirekt über DCs Einfluß nehmen (Abb.1.6).

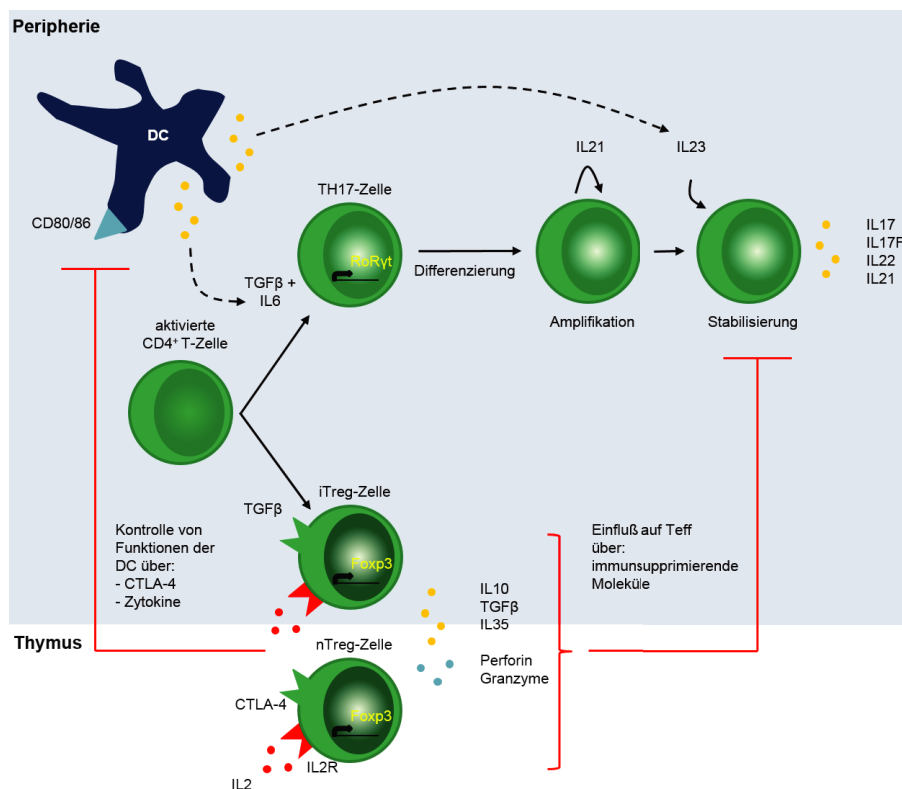


Abbildung 1.6: Darstellung der reziproken TH17- und Treg-Zellentwicklung sowie der Immunregulation durch die Treg-Zellen mithilfe inhibitorischer Zytokine, Treg-vermittelter Zytolyse, Entzug des Zytokins IL2 oder durch Regulation der DC Funktion.

Die Treg-Zellen sind in der Lage inhibitorische Zytokine wie IL10, TGF β oder IL35 zu sekretieren [65, 67, 69]. Das Zytokin IL10 kann die Immunantwort von TH17-Zellen unterdrücken [70], während IL35 die TH17-Zellentwicklung inhibieren kann [71]. TGF β jedoch ist essentiell für die Entwicklung sowohl der TH17-Zellen als auch der iTreg-Zellen, die sich anders als die nTregs in der Peripherie und nicht im Thymus entwickeln. In Kombination mit IL6 oder IL21 ist TGF β in der Lage TH17-Zellen zu induzieren [72], da sowohl IL6 als auch IL21 die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 inhibieren und damit die Hochregulierung des Transkriptionsfaktors der TH17-Zellen RoR γ t begünstigen. Während FoxP3 die TH17-Zelldifferenzierung verhindern kann durch die Suppression der RoR γ t-Aktivität [73, 74]. Die Entwicklung beider Zelltypen ist eng miteinander vernetzt. In Gegenwart des Moleküls RA verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen TH17- und Treg-Zellen in Richtung der Treg-Zellen [75], während der Transkriptionsfaktor HIF1 α durch die Aktivierung der RoR γ t Expression es wiederum in Richtung der TH17-Zellen verschieben kann [76]. Außerdem ist auch der von beiden Zelltypen exprimierte AHR abhängig vom jeweiligen Liganden in der Lage, die Differenzierung sowohl der Treg- als auch der TH17-Zellen zu induzieren [77].

Eine weitere Möglichkeit der direkten Einflußnahme auf die TH17-Zellpopulation besteht in der Treg-vermittelten Zytolyse. Die Expression zytolytischer Moleküle in Treg-Zellen konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden [65, 78, 79].

Durch die Regulation der Funktion dendritischer Zellen haben die Treg-Zellen allerdings auch die Möglichkeit das T-Zellpriming zu inhibieren und damit indirekt die Immunantwort der T-Zellen zu beeinflussen. Die Interaktionen von CTLA-4 mit CD80/CD86, LAG3 mit MHC II oder PD-1 mit PD-L können die DC Reifung behindern, aber auch zu einer Herunterregulation costimulatorischer Moleküle führen [65, 67, 80]. Mithilfe von CTLA-4 z.B. inhibieren die Treg-Zellen die Hochregulation von CD80 und CD86 bei unreifen DCs während der Antigenstimulation oder begünstigen die Runterregulation der genannten Oberflächenmoleküle bei reifen DCs. Weiterhin bewirkt die Interaktion zwischen CTLA-4 und CD80/CD86 die Expression von IDO, einem Schlüsselenzym des Tryptophan Metabolismus, das zur Produktion von Kynurenin führt. Kynurenin ist ein immunsupprimierendes Molekül, das z.B. die Produktion pro-inflammatorischer Moleküle wie IL6 durch DCs inhibiert [67].

Weiterhin erlaubt die konstitutiv hohe Expression von CD25 auf der Treg-Zelloberfläche eine effektive IL2 Bindung und führt gleichzeitig zu einem Entzug, des für die Expansion und das Überleben von T-Zellen notwendigen Zytokins IL2 [67, 80]. Allerdings scheint

im Fall der TH17-Zellen die IL2-Aufnahme durch Treg-Zellen notwendig zu sein für die Expression des Effektormoleküls IL17 [81, 82]. Dafür spricht u.a. eine reduzierte IL17 Produktion nach Depletion von Tregs [83].

1.4.3 Treg-Zellen in der Myasthenie

Treg-Zellen tragen zur Toleranzerhaltung bei und sind in der Lage Autoreaktivität zu hemmen [59]. Im Zusammenhang mit MG gibt es inzwischen verschiedene Studien, die die Rolle der Tregs sowohl in MG Patienten als auch im EAMG Tiermodell beleuchten. Untersuchungen an MG Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen erbrachten im Wesentlichen Defekte in der Immunregulation durch eine verminderte Suppressorfunktion der Treg-Zellen [84–88]. Inwiefern auch eine geringere Anzahl der Tregs und ein damit verbundenes Ungleichgewicht zwischen Tregs und konventionellen T-Zellen bei der MG Entwicklung eine Rolle spielen ist hingegen unklar, da sowohl in der Anzahl veränderte [86] als auch unveränderte [85, 89] Treg-Populationen nachgewiesen werden konnten.

Im EAMG Tiermodell ließen sich ebenfalls funktionale Defizite beobachten: so waren CD4⁺CD25⁺ T-Zellen von AChR-immunisierten Ratten weniger effektiv in der *in vitro* Inhibition der Antigen-induzierten T-Zell Proliferation als Tregs von gesunden Tieren [90]. Außerdem konnten Nessi *et al.* [90] zeigen, dass eine präventive Gabe Tregs in der initialen Phase der Krankheitsinduktion zu einer Reduktion der EAMG Stärke führte, während eine therapeutische Gabe vier Wochen post-Induktion nicht mehr effektiv war. Diese Beobachtung wird auch durch die Studie von Aricha *et al.* gestützt, in der durch eine frühe Gabe ex vivo generierter Treg-Zellen das Fortschreiten der EAMG inhibiert werden konnte [91]. Im Bezug auf eine veränderte Treg-Zellzahl gibt es auch beim EAMG Modell Uneinigkeit [90, 91].

1.4.4 TH17-Zellen in der Myasthenie

TH17-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Erhaltung von Entzündungsreaktionen und werden mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen assoziiert [68]. Erste indirekte Hinweise, für eine Beteiligung der TH17-Zellen an der Pathogenese der MG, konnten mithilfe des EAMG Modells ermittelt werden. Weniger stark ausgeprägte klinische Symptome im Vergleich zu WT Mäusen wurden in IL6 defizienten Mäusen beobachtet, einhergehend mit einer Reduktion der Anti-AChR IgGs, der Keimzentrenbildung sowie mit einer Verringerung des C3-Komplement Serumlevels [92]. Auch die Blockierung des Zytokins IL6 durch Anti-IL6 Antikörper führte sowohl in der akuten als auch

in der chronischen Phase der Erkrankung zu einer Unterdrückung der EAMG [93]. Wie bereits beschrieben, ist IL6 wichtig für die Differenzierung der TH17-Zellen, aber auch das Ausschalten des - als Wachstums- und Stabilisierungsfaktor für die TH17-Zellen charakterisierten - Zytokins IL23 scheint einen Einfluß auf die EAMG zu haben. In IL12^{-/-} Tieren mit einem Knockout der p40 Untereinheit, die sich IL12 und IL23 miteinander teilen, konnten im Unterschied zu WT Mäusen keine neuropysiologischen Hinweise einer EAMG festgestellt werden [94]. Während ein gleichzeitiger Knock-out von IFN γ und der IL12/IL23p40 Untereinheit zu ähnlichen EAMG Symptomen führt wie der WT [95]. Zu den Effektorzytokinen IL17, IL17F, IL21 sowie IL22 der TH17-Zellen gibt es im Hinblick auf die MG ebenfalls erste Beobachtungen. Eine Publikation von Mu *et al.* [96] beschreibt einen Anstieg des IL17 Levels in *tAChR*-immunisierten Ratten im Verlauf der EAMG. Weiterhin weisen erste Versuche von Bai *et al.* mit IL17 defizienten Mäusen auf eine fehlende Erkrankungsinduktion hin [97]. In der Studie wurde der Grad der Muskelschwäche in vier *tAChR*-immunisierten IL17^{-/-} Mäusen analysiert und mit dem in WT Tieren verglichen. Im Hinblick auf die Relevanz von TH17-Zellen bei MG Patienten konnte in einer Studie von Roche *et al.* [98] ein erhöhter IL17 Serumspiegel in Patienten mit einer gMG festgestellt werden. Außerdem konnte von Wang *et al.* [99] in Myasthenie Patienten mit einem Thymom sowohl ein Anstieg der TH17-Zellen als auch eine Korrelation zwischen der Schwere der Erkrankung und der prozentualen TH17-Zellanzahl nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurde für IL22 eine Reduktion in MG Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden beobachtet [100]. Allerdings scheint es hinsichtlich der Effektorzytokine IL17F und IL21 noch keine Studien bezüglich der MG oder EAMG zu geben.

1.5 Bedeutung weiterer IL17-produzierender Immunzellen für die MG

Zur IL17-Zytokin-Familie gehören die Zytokine IL17A-F. Das Zytokin IL17A, dass häufig als IL17 bezeichnet wird, ist in die Entwicklung von Autoimmunität, Entzündungen, Tumoren und in die Abwehr extrazellulärer Erreger involviert [101]. Es wird von CD4⁺ T-Zellen, aber auch von CD8⁺ T-Zellen [102], NK/NKT-Zellen [103, 104], γ/δ T-Zellen [105] und, wie neuste Untersuchungen zeigen, von B-Zellen [106] produziert. Welche Funktionen CD8⁺ T-Zellen in der EAMG wahrnehmen, ist bisher nicht eindeutig zu beantworten. Es gibt sowohl Hinweise auf eine eher regulatorische Funktion, nahegelegt durch die Beobachtung, dass MHC I / CD8 defiziente Tiere eine deutlich aggressivere Form der EAMG

entwickelten als die Kontrollgruppe [107] sowie Hinweise auf eine pathogene Funktion [108]. Die gegensätzlichen Beobachtungen sind wahrscheinlich der Tatsache geschuldet, dass sich die $CD8^+$ ähnlich der $CD4^+$ T-Zellen in heterogene Untergruppen aufspalten lassen. Allerdings gibt es im Bezug zu Tc17-Zellen in der EAMG noch keine Untersuchungen.

NK-Zellen spielen eine Rolle für die EAMG Entwicklung. Shi *et al.* [109] konnte zeigen, dass die Depletion von NK-Zellen zu verminderten EAMG Symptomen führt, nicht aber die Depletion von NKT-Zellen. Hinsichtlich der NK-Zellen lässt sich diese Beobachtung durch die Studie von Liu *et al.* [110] bestätigen. NKT-Zellen scheinen eher eine regulatorische Funktion in Kooperation mit Treg-Zellen zu erfüllen [111].

Im Zusammenhang mit γ/δ T-Zellen fehlen bisher konkrete Studien zu MG oder EAMG.

MG ist eine Autoantikörper-vermittelte Erkrankung. Insofern sind B-Zellen aufgrund ihrer Fähigkeit Antikörper zu produzieren für die Entwicklung der MG als auch der EAMG essentiell [112].

1.6 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte nach der Etablierung des EAMG Krankheitsmodells untersucht werden, welche Relevanz TH17-Zellen für die Pathogenese haben und welchen Einfluß die Depletion von Treg-Zellen in der initialen Phase der EAMG hat.

TH17-Zellen sind wie bereits beschrieben, in die Entstehung und Erhaltung von Entzündungsreaktion, aber auch in die Pathogenese verschiedener Autoimmunerkrankungen involviert. Im Gegensatz dazu spielen Treg-Zellen eine wichtige Rolle bei der Toleranzerhaltung [59] und bilden damit eine Art Gegenpart zu den TH17-Zellen. Interessanterweise ist wie bereits in 1.4.2 beschrieben die Entwicklung beider Zelltypen eng miteinander verknüpft. Besonders in der initialen Phase der EAMG scheinen die Treg-Zellen von Bedeutung zu sein [90][91]. Die Relevanz von TH17-Zellen für T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankungen konnte bereits gezeigt werden, während es hinsichtlich Autoantikörper-vermittelte Erkrankungen bisher nur indirekte Nachweise gibt [113, 114]. Wie unter 1.4.4 veranschaulicht gibt es auch bezüglich der MG oder EAMG erste indirekte Hinweise, die eine Relevanz der TH17-Zellen implizieren. Allerdings ist eine konkrete Beteiligung, der IL17 produzierenden $CD4^+$ T-Zellen an der Pathogenese der MG noch nicht belegt. Daraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

A. Wie wichtig sind die TH17-Zellen für die EAMG? Durch den Vergleich ver-

schiedener Krankheitsparameter von *tAChR*-immunisierten WT und IL17 defizienten Tieren sollte zuerst untersucht werden, ob sich das Fehlen des Zytokins IL17 in auf die EAMG Entwicklung auswirkt. Weiterhin sollte durch die, zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführte, Analyse von *ex vivo* stimulierten TH17-Zellen *tAChR*-immunisierter WT Mäuse festgestellt werden, inwiefern sich die TH17-Population im Krankheitsverlauf verändert. Die daraus resultierenden Beobachtungen sollten ein weiteres Indiz für eine Beteiligung von TH17-Zellen an der EAMG Pathogenese liefern.

Allerdings wird IL17 nicht nur von TH17-Zellen produziert. Um die Frage einer Mitwirkung anderer IL17-produzierender Immunzellen klären zu können, sollten die EAMG Symptome in $\text{TCR}\beta/\delta^{\text{ko}}$ Mäusen, die mit CD4^+ T-Zellen von WT oder IL17^{ko} Mäusen rekonstituiert wurden, evaluiert und miteinander verglichen werden.

B. Welchen Einfluß hat die Depletion der Treg-Zellen in der Induktionsphase der EAMG? Inwiefern die Depletion von Treg-Zellen in der frühen Krankheitsphase einen Einfluß auf die EAMG Entwicklung hat und diese im Zusammenhang steht mit Veränderungen der TH17-Zellpopulation, sollte unter Verwendung sogenannter DEREK Mäuse untersucht werden. Dazu sollten die Krankheitsparameter von *tAChR*-immunisierter WT und Treg-Zell-depletierten DEREK Mäusen analysiert und verglichen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Biochemie

2.1.1 Antigene und Peptide

torpedo und murine AChR Peptide

Peptid Nr.	Amminosäuresequenzen
173	TGKIMWTPPAIFKSY
174	MWTPPAIFKSYCEI
175	QNCTMKLGIWTYDGT
176	MKLGIWTYDGTKVSI
177	IWTYDGTKVSISPES
178	DGTKVSISPESDRPD
179	VSISPESDRPDLSTF
180	PESDRPDLSTF
181	DYRGWKHWVYYTCCP
182	WKHWVYYTCCPDTPY

Tabelle 2.1: *t*AChR-spezifischer Peptidpool P2. Die fett-gedruckten Amminosäuresequenzen markieren das immundominante T-Zell Epitop im EAMG Mausmodell innerhalb des Peptidpools.

Überlappende synthetische *torpedo* und murine AChR Peptide wurden bei JPT (Peptide Technologies GmbH, Berlin, DE) gekauft. Die Peptide umfassen die Alpha-Untereinheit des Rezeptors. Der im Folgenden häufig für Stimulationen eingesetzte *t*AChR-spezifische Peptidpool P2 ist in Tabelle 2.1 dargestellt. Im Anhang befinden sich die Amminosäuresequenzen der *torpedo* (P1, P3, P4, P5) und murinen AChR (P1-P5) Peptidpools (Tab. A 1, 2 und 3).

Aufreinigung des *tAChR*

Die Isolierung des *tAChR* erfolgte in Anlehnung an [55] aus dem Elektroplox des Zitterrochen *torpedo californica*, welches aufgrund seiner Funktion, die in der Erzeugung elektrischer Spannung liegt, reich an AChR ist. 100 g der gefrorenen Gewebesteile wurden in 200 ml Homogenisierungspuffer A mithilfe eines Stabmixers homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenisat auf Zentrifugenröhrchen verteilt und 30 min bei 100 000 *g* und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet ein weiteres Mal mit 100 ml des Homogenisierungspuffers B homogenisiert. Das Homogenisat wurde ebenfalls 30 min bei 100 000 *g* und 4 °C zentrifugiert und der Überstand wurde auch verworfen. Zur Löslichmachung des membrangebundenen AChR wurde das Pellet in 10 ml Homogenisierungspuffers B, der mit 1% Triton-X-100 versetzt wurde, homogenisiert und anschließend 1 h bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Um einer Degradierung durch Proteasen vorzubeugen wurden alle Medien immer frisch mit PMSF versetzt. Am Schluss wurde das Lysat 30 min bei 100 000 *g* und 4 °C zentrifugiert und der Überstand, welcher den gelösten *tAChR* enthielt, abgenommen.

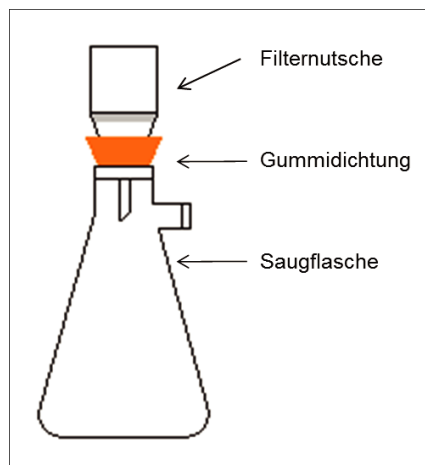


Abbildung 2.1: Vakuumfiltrationsaufbau

Die Aufreinigung des *tAChR* erfolgte letztlich über eine Affinitäts-Chromatographie. Dafür wurde am Tag zuvor Alpha-Cobratoxin an CNBr-aktivierte Sepharose 4B Beads gekoppelt. Zur Äquilibration und Erhaltung der Aktivierung wurden 0.6 g Beads 15 min bei RT in gekühltem Waschpuffer inkubiert. Parallel dazu wurden 4 mg Alpha-Cobratoxin in 4 ml Kopplungspuffer gelöst, um eine Konzentration von 1 mg/ml zu erreichen. Zur

Kontrolle der Kopplungseffektivität wurde die OD der Cobratoxin-Lösung sowohl vor der Bindung an die Beads als auch danach mithilfe eines Biophotometers bei 280 nm bestimmt.

Puffer	Konzentration	Hersteller
Homogenisierungspuffer A: Homogenisierungspuffer B + NaCl	0.1 M	C.Roth,KA,DE
Homogenisierungspuffer B: Tris pH8	0.01 M	C.Roth,KA,DE
EDTA pH8	1 mM	C.Roth,KA,DE
NaN ₃	0,01%	AppliChem,DA,DE
PMSF (in Ethanol gelöst)	0.01 mM	Sigma-Aldrich,M,DE
Kopplungspuffer: NAHCO ₃	0.1 M	
NaCl pH8,3	0.5 M	C.Roth,KA,DE
Waschpuffer für Beads: HCl	1 mM	
Blocking Puffer: Glycin pH8	0.2 M	Sigma-Aldrich,M,DE
Waschpuffer 1: Homogenisierungspuffer A + Triton-X-100	0,1%	Nerak Laborat GmbH,B,DE
Waschpuffer 2: Homogenisierungspuffer B + NaCl	1 M	C.Roth,KA,DE
Dialysepuffer: Homogenisierungspuffer A + Triton-X-100 (ohne PMSF)	0,1%	Nerak Laborat GmbH,B,DE
Elutionspuffer: Dialysepuffer + Carbamylcholin Chlorid	0.7 M	Sigma-Aldrich,M,DE

Tabelle 2.2: Hergestellte Puffer für die Aufreinigung des *tAChR*

Die äquilibrierten Beads wurden vor der Kopplung nochmal mit 100 ml Waschpuffer

mittels eines Vakuumfiltrationsaufbaus (Abb.2.1) gewaschen. Vor der eigentlichen Kopplung wurde der Waschpuffer gegen den Kopplungspuffer getauscht. Dieser Schritt wurde so kurz wie möglich gehalten, weil der basische pH des Kopplungspuffers sonst zur Hydrolyse der reaktiven Gruppen der Bead-Matrix führt. Erst danach wurden die aktivierten Beads mit der Cobratoxin-Lösung für 2 h auf dem Schüttler bei RT inkubiert. Zum Absättigen verbliebender freier Bindungsstellen wurden die gekoppelten Beads mit 70 ml Blocking Puffer gewaschen und schließlich nochmal mit 30 ml Blocking Puffer für 30 min bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit Homogenisierungspuffer A wurden die Cobratoxin-gekoppelten Beads mit der, aus den elektrischen Organen des Zitterrochens isolierten, *tAChR*-Lösung auf dem Schüttler und im Kühlschrank über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die *tAChR*-beladenen Cobratoxin-gekoppelten Beads wieder in die Filternutsche des Vakuumfiltrationsaufbaus überführt, der Durchfluss wurde aufgefangen, um zu einem späteren Zeitpunkt den restlichen in Lösung befindlichen *tAChR* aufzureinigen. Doch vorerst wurden die beladenen Beads mit 100 ml Waschpuffer 1 gewaschen, mit 100 ml Waschpuffer 2 und zum Schluss nochmal mit 100 ml Waschpuffer 1. Anschließend wurde der *tAChR* in 5 ml Elutionspuffer für 1 h 30 min bei RT auf dem Schüttler von den Beads eluiert. Mithilfe des Vakuumfiltrationsaufbaus wurden die Beads von dem Eluat separiert und ein weiteres Mal für 30 min in Elutionspuffer inkubiert, um verbliebenen *tAChR* zu lösen.

Das Eluat wurde anschließend in einen Dialyseschlauch überführt und gegen den Dialysepuffer dialysiert. Die Dialyse erfolgte in einem 2 l Becherglas im Kühlschrank mithilfe eines Magnetfeldrührers. Der Dialysepuffer wurde alle 2 h gewechselt. Zum Tausch des gesamten Puffers gegen 1xPBS wurden Vivaspin20 Röhrchen verwendet. Die Konzentration des *tAChR* wurde mittels eines BCA Protein Assay Kits (s. Best. d. Proteinkonzentration) bestimmt und vor dem Einfrieren mit 1xPBS auf 0.5 mg/ml eingestellt. Anschließend wurde der *tAChR* bei -80°C eingefroren.

Gewinnung eines mAChR Lysats

Zur Gewinnung eines mAChR Lysats wurden BC3H1-Zellen (s. Kultivierung BC3H1) verwendet. Die BC3H1-Zellen wurden mittels 3 ml Trypsin/EDTA-Puffer je Zellkulturflasche gelöst und in 1xPBS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in 50 ml-Gefäße überführt und mit 1xPBS bei 300 g für 5 min bei RT gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde für 15 min in 1 ml RIPA-Puffer je 1×10^7 Zellen auf Eis inkubiert. Mithilfe des RIPA-Puffers wird die Membranstruktur gelöst und membrangebundene Proteine wie

Puffer	Konzentration	Hersteller
RIPA-Puffer:		
Tris pH7,4	50 mM	C.Roth,KA,DE
NaCl	150 mM	C.Roth,KA,DE
Triton-X-100	1%	Nerak Laborat GmbH,B,DE
SDS	0,1%	C.Roth,KA,DE
Natriumdesoxycholat	1%	Sigma-Aldrich,M,DE
Protease Inhibitor		Roche Diagnostics,MA,DE

Tabelle 2.3: Hergestellter Puffer für die Gewinnung eines mAChR Lysats

der AChR gehen in Lösung. Durch das Zentrifugieren bei 17 968 *g* für 5 min bei 4 °C wurde der mAChR vom verbliebenen Pellet separiert. Das mAChR Lysat wurde schließlich bei –20 °C weggefroren.

2.1.2 Proteinanalyse

Zur Analyse des AChR wurde dieser mittels SDS-PAGE hinsichtlich der molekularen Größe seiner Untereinheiten elektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis des aufgetrennten Rezeptors erfolgte schließlich durch Western Blotting, der parallel zu einer Silberfärbung durchgeführt wurde. Die Silberfärbung gab Aufschluß über den Reinheitsgrad des aufgereinigten Proteins.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mithilfe eines BCA Protein Assay Kits. Die Rezeptur enthält BCA als auch Cu^{2+} Ionen. Die Cu^{2+} Ionen werden in alkalischer Lösung durch Protein zu Cu^{1+} reduziert (Biuret Reaktion). Ein Cu^{1+} bildet zusammen mit zwei BCA Molekülen ein Chelatkomplex. Diese Reaktion ist hoch-sensitiv und führt zu einer violetten-Färbung des Produkts, welches bei 562 nm eine starke Absorbanz aufweist, die annähernd linear mit zunehmender Proteinkonzentration ist.

Als Referenz wurden mithilfe einer Verdünnungsreihe unterschiedliche BSA Konzentrationen hergestellt. Von den Referenzkonzentrationen sowie von dem zu quantifizierenden Protein wurden je 25 μl in eine 96-well Platte pipettiert und für 30 min bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Anschließend wurde die Extinktionsmessung mittels MRX-Reader durchgeführt. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte mithilfe einer Eichgerade des Standards.

SDS-PAGE

Mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde der AChR aufgetrennt. Es wurden 12,5 %ige Gele verwendet, die überwiegend selbst gegossen wurden. Dafür wurde unmittelbar nach Zugabe von APS und TEMED, welche die radikalische Polymerisation in Gang setzen, zuerst das Trenngel und später das Sammelgel, zwischen zwei mit Abstandhaltern (1 mm) verdichteten Glasplatten, gegossen. Das Trenngel wurde nach dem Gießen noch mit Isopropanol überschichtet, das erst nach dem Auspolymerisieren abgesaugt wurde.

Puffer	Konzentration	Hersteller
Laufpuffer: (1-fach)		
Glycin	373 mM	Sigma-Aldrich,M,DE
Tris	49.5 mM	Sigma-Aldrich,M,DE
SDS	0,1%	C.Roth,KA,DE
Puffer	Menge	Hersteller
Trenngelpuffer: (6 ml je Gel)		
30% Acrylamid-/	2.5 ml	C.Roth,KA,DE
0,8% Bisacrylamid-Mischung		
0,5% SDS	1.2 ml	C.Roth,KA,DE
bidest.H ₂ O	1.1 ml	Reinstwasseranlage
TEMED	5 µl	Sigma-Aldrich,M,DE
10% APS	30 µl	Sigma-Aldrich,M,DE
1.88 M Tris pH8,8	1.2 ml	Sigma-Aldrich,M,DE

Tabelle 2.4: Hergestellte Puffer für die SDS-PAGE

Schließlich wurden die Gele in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt und mit Laufpuffer überschichtet. Die Proteinproben wurden in SDS-Ladepuffer aufgenommen und bei 95 °C 5 min erhitzt. Diese Schritte dienen der Denaturierung des Proteins, dessen molekulare Struktur, einerseits chemisch durch Detergenz (SDS) und β -Mercaptoethanol, andererseits physikalisch durch das Aufkochen im Heizblock, aufgelöst wurde. Anschließend wurden je 3 µg des denaturierten Proteins in eine Geltasche mithilfe einer 50 µl-Hamilton-Pipette eingefüllt. Als Marker wurde SeaBlue[®]Plus2 verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100 V für etwa 1 h 30 min.

Puffer	Menge	Hersteller
Sammelgelpuffer: (2 ml je Gel)		
30% Acrylamid-/	0.33 ml	C.Roth,KA,DE
0,8% Bisacrylamid-Mischung		
0,5% SDS	0.4 ml	C.Roth,KA,DE
bidest.H ₂ O	0.87 ml	Reinstwasseranlage
TEMED	2 µl	Sigma-Aldrich,M,DE
10% APS	10 µl	Sigma-Aldrich,M,DE
0.625 M Tris pH6,8	0.4 ml	Sigma-Aldrich,M,DE
SDS-Ladepuffer: (2-fach,10 ml)		
Glycerin	2 ml	
10% SDS	1 ml	C.Roth,KA,DE
bidest.H ₂ O	3.9 ml	Reinstwasseranlage
0,8% Bromphenolblau-Lösung	100 µl	Sigma-Aldrich,M,DE
β-Mercaptoethanol	1 ml	Serva,HD,DE
0.625 M Tris pH6,8	2 ml	Sigma-Aldrich,M,DE

Tabelle 2.5: Hergestellte Puffer für die SDS-PAGE

Western Blotting

Nach der Elektrophorese wurde das SDS-Gel, in Vorbereitung für den Western Blot, in den Transferpuffer überführt. Es wurde das Semidry-Blot-Verfahren angewandt. Hierfür wurden 6 Whatman®Paper und eine Nitrocellulose Membran in Größe des Gels zugeschnitten und ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer der negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulose Membran findet durch das Anlegen einer Spannung statt. Die Spannung wird hierbei senkrecht zum Blot-Aufbau angelegt. Beim Blot-Aufbau ist zu beachten, dass die Proteine in Richtung der Anode (hier: unten) wandern. Der Blot wurde deshalb, in folgender Reihenfolge luftblasenfrei übereinander geschichtet: 3 Whatman®Paper, eine Nitrocellulose Membran, das Gel und 3 Whatman®Paper. Es wurden für 1 h 15 V angelegt.

Anschließend wurde der Blot in Blocking Puffer überführt und für 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert, um freie Proteinbindungsstellen abzusättigen. Zur Detektion des AChRs wurde im Fall von *tAChR* ein Primär-Antikörper (anti-CHRNA) verwendet, der spezifisch an die gamma und delta Untereinheit des Rezeptors bindet. Während der

Primär-Antikörper für den Nachweis des mAChRs (anti-CHRNA) spezifisch an die beta Untereinheit bindet. Beide Primär-Antikörper wurden mit Blocking Puffer verdünnt und über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler mit dem Blot inkubiert.

Puffer	Konzentration	Hersteller
Transferpuffer: Laufpuffer (s.SDS-Puffer) + Methanol	15%	C.Roth,KA,DE
TBS: (1-fach) Tris pH7,4 NaCl	10 mM 150 mM	Sigma-Aldrich,M,DE C.Roth,KA,DE
TBST: TBS + Tween 20	0,1%	Sigma-Aldrich,M,DE
Blocking Puffer: TBST + Milchpulver	5%	C.Roth,KA,DE

Tabelle 2.6: Hergestellte Puffer für den Western Blot

Am folgenden Tag wurde der Blot mit TBST gewaschen (je 3x5 min und 3x1 min), um ungebundenen Primär-Antikörper zu entfernen. Parallel wurde der Sekundär-Antikörper (HRP-Konjugat), der an den Primär-Antikörper bindet, mit Blocking Puffer verdünnt und anschließend 1 h bei RT auf dem Schüttler mit dem Blot inkubiert. Danach wurde der Blot ein weiteres Mal gewaschen (s.o.) und entwickelt. Die Detektion des Proteins basiert auf einer Antikörper-vermittelten Chemilumineszenz-Reaktion. Dabei katalysiert das HRP des Sekundär-Antikörpers die Oxidation des Luminols mit Wasserstoffperoxid, wodurch Licht emittiert wird. Für die Entwicklung des Blots wurde dieser mit Detektions-Reagenz etwa 1 min inkubiert, überschüssige Flüssigkeit wurde entfernt und die Chemilumineszenz wurde entweder mithilfe einer hochempfindlicher Kamera oder durch einen lichtempfindlichen Film sichtbar gemacht.

Silberfärbung

Zur Bestimmung der Reinheit des tAChR wurde eine Silberfärbung durchgeführt. Die Silberfärbung basiert auf der Anlagerung von Silber-Ionen an negativ geladene Moleküle, in diesem Fall an die negativ geladenen Aminosäuren in den Proteinen. Dafür werden erst die Proteine in dem SDS-Gel durch Ethanol und Essigsäure fixiert, um Diffusion vorzubeugen. Gleichzeitig werden dabei Substanzen des Gels herausgewaschen wie Tris,

SDS und Glycin. Silbernitrat liefert die Silber-Ionen, welche zu elementaren Silber durch alkalisches Formaldehyd reduziert werden und dadurch zu einer Färbung der Banden führen.

Die Silberfärbung wurde mithilfe des PageSilverTM Silver Staining Kits von Fermentas durchgeführt, dabei wurde das Protokoll verwendet, das die Proteine maximal-sensitiv visualisieren konnte. Die Nachweisgrenze lag hier bei 0.05 ng Protein. Die Methode ist deutlich sensitiver als die Färbung mit Coomassie.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Zellzählung und Vitalitätsprüfung

Die Zellzählungen wurde mit einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer unter einem Lichtmikroskop durchgeführt, die folgende Abmessungen besaß: Fläche pro Großquadrat = 1 mm² und Kammertiefe = 0.2 mm. Die Formel 2.1 wurde zur Berechnung der Zellzahl verwendet.

$$\frac{\text{gezählte Zellen}}{\text{ausgezählte Fläche (mm}^2\text{)} \cdot \text{Kammertiefe (mm)}} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} = \frac{\text{Zellen}}{\mu\text{l}} \quad (2.1)$$

Die BC3H1-Zellen wurde dafür im Verhältnis 1:5 mit Trypanblau gefärbt, vermischt und unmittelbar danach gezählt, da der Farbstoff zytotoxisch für die Zellen ist. Trypanblau bindet an die Proteine im Zellinneren dadurch färben sich tote Zellen dunkelblau. Während Lebende Zellen den Farbstoff nicht aufnehmen, da Trypanblau nicht membrangängig ist. Um die Leukozyten der Milz besser zählen zu können, wurden die murinen Milzzellen im Verhältnis 1:2 mit Türks-Lösung gefärbt. Der Farbstoff färbt die Leukozyten an und die enthaltene Essigsäure hämolysiert die Erythrozyten der Milz.

2.2.2 Kultivierung der BC3H1 Zelllinie

Die Zelllinie BC3H1 ist eine adhärent wachsende, muskel-ähnliche Zelllinie des Mausstammes C3H, die in der Lage ist den murinen Acetylcholinrezeptor zu exprimieren. Die BC3H1-Zellen wurden kurz bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, unverzüglich in vorgewärmtem Kulturmedium aufgenommen und in eine belüftete 25 mm² Zellkultur-Flasche überführt. Die Zellen wurden im Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Am Folgetag wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und gegen frisches Kulturmedium ersetzt,

Medium	Konzentration	Hersteller
DMEM: Kulturmedium		Biochrom AG,B,DE
+ NaHCO_3	3.7 g/l	
+ D-Glucose	4.5 g/l	
+ stabiles L-Glutamin	4 mM	
+ Natriumpyruvat	1 mM	Biochrom AG,B,DE
+ FCS	20%	Biochrom AG,B,DE
optional Antibiotika:		
+ Penicillin/ Streptomycin	100 U/ml/ 100 µg/ml	Biochrom AG,B,DE
Einfriermedium: Kulturmedium + + DMSO	5%	Sigma-Aldrich,M,DE

Tabelle 2.7: Medien für die BC3H1-Zelllinie

um die Zellen von Resten des Einfriermediums zu befreien. Das im Einfriermedium enthaltene DMSO verhindert zwar die Eiskristallbildung beim Einfrieren, wirkt allerdings auch toxisch auf die Zellen.

Die Zellen wurden zweimal pro Woche gesplittet, anfänglich im Verhältnis 1:2 später 1:10. Dafür wurde zuerst das alte Kulturmedium aspiriert und die Zellen für 5 min mit 0,05% Trypsin/0,02% EDTA bei RT inkubiert, bis sich die adhärenierten Zellen vom Flaschenboden zu lösen begannen. Anschließend wurde die Zellsuspension in vorbereitetes 1xPBS pipettiert und die Zellkulturflasche wurde noch zweimal mit 1xPBS gespült, um den Zellverlust zu minimieren. Die Zellen wurden bei 300 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in frischem Kulturmedium resuspendiert. Zur Kultivierung wurden die gelösten Zellen schließlich auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie beim Splitten bei 300 g für 5 min zentrifugiert, anschließend in Einfriermedium aufgenommen und unmittelbar auf Kryoröhrchen verteilt. Die Kryoröhrchen wurden mit einer Einfrierhilfe auf -80°C weggefroren und wurden im gefrorenen Zustand in den Stickstofftank überführt.

2.3 *in vivo*

2.3.1 Verwendete Maus-Stämme

C57BL/6J Tiere im Alter von 10 bis 12 Wochen wurden bei Charles Rivers bestellt und bei Ankunft am Standort Charité am Campus Mitte in der Tierhaltung der experimen-

tellen Neurologie untergebracht. Die Tiere wurden mit Enrichment gehalten und hatten uneingeschränkt Zugang zu Futter und Wasser. C57BL/6J Mäuse mit einem IL17^{ko} [115] wurden vom Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie (Berlin) zur Verfügung gestellt. Vom Deutschen Rheuma-Forschungszentrum (Berlin) wurden die TCR ^{β/δ ko} Tiere [116] sowie die DEREK Mäuse [117] bezogen. Die DEREK Mäuse sind eine BAC transgene Mauslinie. BACs werden für die Klonierung und Transfektion größerer Genabschnitte verwendet. Im Fall der DEREK Mäuse wurde mittels BAC Technologie ein DTR-eGFP codierender Genabschnitt transfiziert. Die DEREK Mäuse exprimieren ein DTR-eGFP Fusionsprotein unter der Kontrolle des Foxp3-Promotors. Das Fusionsprotein ermöglicht sowohl eine Detektion als auch eine spezifische Depletion der Foxp3⁺ Treg-Zellen, die durch die Gabe von DT erreicht wird [117–119]. DT inhibiert sehr effektiv die Proteinsynthese in eukaryotischen Zellen und führt zum Zelltod. Allerdings sind murine Zellen aufgrund ihrer Oberflächenmoleküle normalerweise unempfindlich gegenüber einem DT-induzierten Zelltod außer die Zellen exprimieren den DT-empfindlichen Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche [120, 121]. Die Treg-Zellen lassen sich so zu 95-98% jederzeit depletieren. Jedoch ist nur eine temporäre Depletion möglich, da Transgen-negative Foxp3⁺ Treg-Zellen wieder hochwachsen. Nach 5 Tagen finden sich wieder erste Treg-Zellen und nach zwei Wochen ist die Anzahl der Treg-Zellen wieder normal [119]. Allerdings gibt es noch weitere BAC transgene Mauslinien von Suffner *et al.* mit unterschiedlichen Depletionseffizienzen: Foxp3.luciDTR3 70%, Foxp3.luciDTR4 90-95% und Foxp3.luciDTR5 >99% [118]. Alle Experimente wurden nach geltenden Tierversuchsbestimmungen durchgeführt und von der zuständigen Behörde genehmigt.

2.3.2 Induktion und klinische Evaluierung der EAMG

Die Induktion der EAMG erfolgte durch die Immunisierung der Mäuse mit *tAChR* (40 µg/Maus) emulgiert in CFA in Anlehnung an Wu *et al.* [55]. Die Emulsion wurde den Mäusen *s.c.* auf Schulter- und Schwanzhöhe unter Ketamin (100 mg/kg)/Xylazin (8 mg/kg) Anästhesie injiziert. Nach jeder Immunisierung wurde den Tieren drei Tage in Folge Buprenorphin (0.05 mg/kg) zur Analgesie *i.p.* gegeben. Booster Immunisierungen wurden 4 und 8 Wochen nach der ersten Immunisierung durchgeführt. Um die Mäuse über diesen Zeitraum spezifisch beobachten zu können, wurden während der Anästhesie zur ersten Immunisierung Ohrmarkierungen gesetzt.

Die Daten zur klinische Evaluierung der EAMG wurde ab der dritten Woche nach der ersten Immunisierung wöchentlich erhoben mithilfe des sogenannten Paw Grip Tests. Die

Evaluierung fand verblindet statt und wurde folgendermaßen ausgeführt: um eine für die Muskeln anstrengende Situation zu schaffen, sollten die Mäuse 1 min lang mit ihren Pfoten wiederholt das Käfiggitter greifen und loslassen. Die Muskelkraft der Vorderpfoten und Veränderungen in der Haltung und im Bewegungsablauf wurden vor (a) und nach (b) dieser Übung bewertet. Die Bewertung der EAMG erfolgte anhand der folgenden Skala: 0 Punkte = normale Muskelstärke, keine Verhaltensauffälligkeit; 1 Punkt = abnehmende Muskelkraft, Verhalten ist vor der Übung unauffällig, danach ist die Maus weniger aktiv; 2 Punkte = schwacher Griff, sowohl vorher als auch nach der Übung weniger aktiv; 3 Punkte = Muskelkraft hat stark nachgelassen, kaum ein Festhalten am Gitter detektierbar, stark abgenommene Aktivität; 4 Punkte = kein Griff mehr, Paralyse. Mäuse, die die maximale Punktzahl erreichten, wurden getötet. Kontrolltieren wurde ein vergleichbares Volumen an 1xPBS emulgiert in CFA injiziert.

Im Fall der DEREG Mäuse wurden die Treg-Zellen durch die Gabe von 1 µg Diphtherie-Toxin an zwei aufeinanderfolgenden Tagen vor der ersten Immunisierung depletiert. Das in 1xPBS gelöste Toxin wurde bei -80°C gelagert und vor der Injektion immer frisch aufgetaut.

2.3.3 EMG

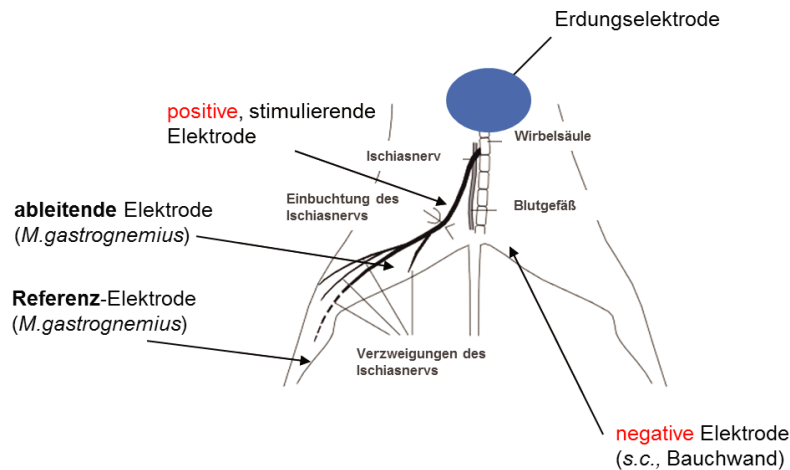


Abbildung 2.2: EMG Messung bei der Maus. Modifiziertes Bild von Wu *et al.* [55]

Die EMG ist eine diagnostische Methode, mit der Erkrankungen von Nerven- und Muskelzellen festgestellt werden können. Dabei wird die elektrische Muskelaktivität gemessen. Im Fall von MG lässt sich bei einer wiederholten Stimulation des Muskels ein sogenanntes

Dekrement detektieren. Als Dekrement ist die 10%ige Abnahme der 5. Amplitude im Vergleich zur 1. Amplitude definiert. Für die Messung wurden die Tiere mit Ketamin/Xylazin narkotisiert und mittels Klebestreifen auf einer Wärmeplatte (37 °C) fixiert. Die Erdungselektrode wurde auf dem Bauch der Maus durch ein Band gehalten, während die Nadelelektroden wie folgt positioniert wurden: die positive, stimulierende Elektrode in der Nähe des *N. ischiadicus*; die negative Elektrode *s.c.* in die Bauchwand; die ableitende und die Referenz-Elektrode im *M. gastrocnemius* derselben Seite (Abb. 2.2). Der Nerv wurde mit 3 Hz 10mal supramaximal stimuliert, die entstehenden Aktionspotentiale mithilfe der ableitenden Elektrode gemessen und die Amplituden der Aktionspotentiale miteinander verglichen.

2.4 Immunologie

2.4.1 T-Zell Stimulation

Stimulation der Milzzellen

Für die Stimulation der Milzzellen wurden die Mäuse, 4 Wochen nach der letzten Immunisierung, getötet. Die Milzen wurden entnommen und das Gewebe der Milz mithilfe des Kolbenendes einer 2 ml Einwegspritze aufgebrochen, um die Zellen aus dem Gewebeverband zu lösen. Zur Herstellung einer Zellsuspension wurden die Milzzellen mittels PBS aus dem Gewebe gespült und durch ein 40 µm Zellsieb filtriert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation mit PBS bei 310 *g* für 10 min und 4 °C gewaschen. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in RPMI resuspendiert und nochmal durch 30 µm CellTrics® gefiltert, um die Zellen zu vereinzeln. Die Zellen wurden gezählt und der Stimulationsansatz konnte hergestellt werden.

Die Stimulation wurde in 5 ml FACS-Polystyrolgefäßen durchgeführt. Dafür wurden 5×10^6 Zellen in 1 ml RPMI Medium bei 37 °C und 5% CO₂ für 16 h mit einem *tAChR* Peptidpool (1 µg/ml) (P2) stimuliert. Brefeldin A wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml 2 h nach Stimulationsbeginn dazugegeben, um den Golgi-Apparat zu blockieren und die Sekretion der Zytokine zu verhindern. Mit PMA 10 ng/ml und Ionomycin 1 µg/ml stimulierte und unstimulierte Ansätze dienten als Positiv- bzw. als Negativkontrolle.

Medium	Konzentration	Hersteller
RPMI:		Biochrom AG,B,DE
+ NaHCO_3	2 g/l	
+ FCS	10%	Biochrom AG,B,DE
+ β -Mercaptoethanol	50 μM	Life techn.,DA,DE (Gibco)
+ Penicillin/ Streptomycin	100 U/ml/ 100 $\mu\text{g/ml}$	Biochrom AG,B,DE
1xPBS:		Biochrom AG,B,DE
+ BSA	0,5%	Serva,HD,DE
+ EDTA	2 mM	C.Roth,KA,DE

Tabelle 2.8: Medien für die T-Zell Stimulation

Stimulation der murinen PBMCs

Die Stimulation der murinen PBMCs wurde entsprechend der Milz-Zell-Stimulation durchgeführt mit einigen wenigen Abweichungen. Zwei Wochen nach den jeweiligen Immunisierungen wurde den Mäusen mit einer Lanzette *s.m.* Blut abgenommen und gepoolt. Das Blut wurde mithilfe von Blutsammelgefäße aufgefangen, in die 50 μl Heparinlösung (500 U/ml) vorgelegt wurde. Zur Lyse der Erythrozyten wurden die Blutproben im Verhältnis 1:5 mit EL Puffer vermischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben mittels Zentrifugation in PBS bei 310 *g* für 10 min und 4 °C zweimal gewaschen. Es wurde 1×10^6 Zellen in 500 μl RPMI Medium bei 37 °C und 5% CO_2 für 6 h unter den oben beschriebenen Bedingungen stimuliert.

2.4.2 Analyse der Durchflußzytometrie

Nach der Stimulation der murinen Zellen wurde die Population der CD4^+ T-Zellen hinsichtlich ihrer antigenspezifischen Zytokinproduktion durchflußzytometrisch untersucht. Dabei standen zwei Subpopulationen der CD4^+ T-Zellen: die TH17- und Treg-Zellen im Focus der Analyse. Die folgenden Antikörper und Reagenzien wurden für die intrazelluläre Zytokinfärbung verwendet: anti-Maus CD3, CD4, CD40L, $\text{IFN}\gamma$, IL17A, IL2, IL21 und Live/Dead Ausschluß-Reagenz. Zum Nachweis der Treg-Zellen wurden anti-Maus CD3, CD4, HELIOS, Foxp3-Antikörper und Live/Dead Ausschluß-Reagenz benutzt.

Die Zellen wurden im Anschluß der Stimulation mit 2 ml gekühltem PBS bei 310 *g* für 5 min und 4 °C gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und die Oberflächenmarker wurden für 20 min und 4 °C gefärbt. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen erneut gewaschen, mit 500 μl Foxp3 Fixierungspuffer 35 min inkubiert und bei 400 *g* für 5 min und 4 °C

Antikörper/Reagenz	Konz.	Klon	Hersteller
α CD3 A700	1:200	17A2	eBiosciences,F,DE
α CD4 PE-Cy7	1:80	RM4-5	Biolegend,L,UK
α CD40L APC	1:20	MR1	Miltenyi,GL,DE
α IFN γ PacBlue	1:200	XMG1.2	Biolegend,L,UK
α IL17A PerCP-Cy5.5	1:50	TC11-18H10.1	Biolegend,L,UK
α IL2 FITC	1:100	JES6-5H4	eBiosciences,F,DE
α IL21 PE	1:80	mhalx21	eBiosciences,F,DE
α HELIOS PacBlue	1:100	22F6	Biolegend,L,UK
α Foxp3 PerCP-Cy5.5	1:100	FJK-16s	eBiosciences,F,DE
Live/Dead Aqua	1:200		Life techn.,DA,DE (Invitrogen)

Tabelle 2.9: Antikörper für die Analyse der Durchflußzytometrie

zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit 500 μ l Foxp3-Permeabilisierungspuffer gewaschen, der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden mit den Antikörpern für die intrazelluläre/-nukleäre Färbung für 40 min inkubiert. Zur Entfernung überschüssiger Antikörper wurden die Proben ein zweites Mal mit 500 μ l Foxp3-Permeabilisierungspuffer bei 570 g für 5 min und 4 °C gewaschen. Für die Messung wurden die Zellen in 400 μ l PBS resuspendiert.

Alle Proben wurden am LSR II im Zentrallabor für Zytometrie und Zellsortierung (FCCF) am Deutschen Rheuma-Forschungszentrum Berlin mittels FACSDiva Software gemessen. Die resultierenden Datensätze wurden mit FlowJo Software analysiert.

2.4.3 Adoptiver CD4⁺ T-Zell Transfer

Antikörper	Konz.	Klon	Hersteller
α CD3 PacBlue	1:100	17A2	Biolegend,L,UK
α CD4 FITC	1:100	GK1.5	Miltenyi,GL,DE
α TCR γ/δ PE	1:100	UC7-13D5	Biolegend,L,UK
α NK1.1 PerCP	1:100	PK136	Biolegend,L,UK
α FITC Beads	1:10		Miltenyi,GL,DE

Tabelle 2.10: Antikörper für den adoptiven CD4⁺T-Zell Transfer

Die zum adoptiven Transfer verwendeten CD4⁺T-Zellen wurden aus Milzen und Lymphknoten naiver WT und IL17ko Tiere isoliert. Dafür wurden die Zellen mit einem anti-Maus CD4 Antikörper, der an FITC gekoppelt war, für 10 min bei 4 °C gefärbt und anschließend mit anti-FITC Beads für 15 min bei 4 °C inkubiert. Zur Entfernung überschüssiger

Antikörper oder Beads wurden die Zellen mit PBS bei 350 *g* für 5 min und 4 °C gewaschen. Mithilfe des QuadroMACS Separators wurden die CD4⁺T-Zellen über LS Säulen sortiert. Um eine Aussage über den Reinheitsgrad der CD4⁺T-Zellen machen zu können, wurden die Zellen durchflußzytometrisch analysiert. Dafür wurden die Zellen mit folgenden Antikörpern gefärbt: anti-Maus CD3, TCR γ/δ und NK1.1. Schließlich wurden je 8×10^6 isolierte CD4⁺T-Zellen TCR β/δ ko Empfänger-Mäusen *i.v.* in die Schwanzvene injiziert. Der adoptive Transfer fand 3 Wochen vor der EAMG Induktion statt, die wie bereits beschrieben durchgeführt wurde.

2.4.4 ELISA

Zum Nachweis von *tAChR*-spezifischen Antikörpern und Autoantikörpern wurde das Blutserum der Mäuse mittels ELISA analysiert. Dafür wurde den Tieren 3 Wochen nach jeder Immunisierung mit einer Lanzette *s.m.* Blut abgenommen und in Blutsammelgefäße aufgefangen. Nach der Koagulation des Blutes wurden die Proben bei 15 720 *g* für 5 min und RT zentrifugiert, um das Serum vom Zelldebris zu separieren. Anschließend wurde das Serum bis zur ELISA Durchführung bei –20 °C gelagert.

Puffer	Konzentration	Hersteller
Waschpuffer: 1xPBS + Tween 20	0,1%	Biochrom AG,B,DE Sigma-Aldrich,M,DE
Blocking Puffer: Waschpuffer + BSA	3%	Serva,HD,DE

Tabelle 2.11: Puffer für die Durchführung des ELISAs

tAChR-spezifischer ELISA

Für die Analyse der *tAChR*-spezifischen Antikörper wurden 96-Well Immunoplaten mit je 100 μ l des aufgereinigten *tAChR* (3 μ g/ml in PBS) pro Well beschichtet und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Platten zweimal mit Waschpuffer gewaschen, um nicht gebundenen *tAChR* zu entfernen, und danach für 1 h bei 37 °C mit Blocking Puffer inkubiert, um freie Bindungsstellen auf den Platten abzusättigen. Eine serielle Verdünnung der Serumproben mit Blocking Puffer wurde hergestellt, diese wurde

in die Wells pipettiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurden die Platten dreimal gewaschen und mit einem AP-konjugierten anti-Maus IgG Antikörper (0.1 µg/ml in Blocking Puffer) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach weiterem dreimaligen Waschens wurde die Detektionsreagenz dazugegeben und die enzymvermittelte Farbreaktion konnte bei RT für 15 min unter Lichtausschluss stattfinden. Zur Detektion der an den *tAChR* gebundenen Antikörper wurde ein PNPP Phosphatase Substrat Kit verwendet. Durch Abspaltung eines Phosphates vom Substrat PNPP durch das Enzym AP des Sekundär-Antikörpers entsteht p-Nitrophenol. p-Nitrophenol ist gelb und lässt sich photometrisch messen.

Mit 2 M NaOH wurde die Farbreaktion gestoppt und die ELISA-Platten wurden bei 405 nm am MRX-Reader gemessen.

mAChR-spezifischer ELISA

Um die mAChR-spezifischen Antikörper zu detektieren, wurden je 100 µl/Well des mAChR Lysats der BC3H1-Zelllinie in α -Bungarotoxin (3 µg/ml in PBS) beschichteten 96-Well Immunoplaten für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach dem Waschen wurden die in Blocking Puffer verdünnten Serumproben (1:10) in die Wells pipettiert und für 1 h 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der ELISA wie vorher beschrieben, durchgeführt. Mit einer Ausnahme: Die Inkubationszeit der Detektionsreagenz betrug hier 30 min.

Bei der ELISA-Auswertung wurde der gemessene OD-Hintergrundwert von Seren unimmunisierter Kontrolltiere subtrahiert und nur Proben die einen OD-Wert über diesen Hintergrundwert besaßen, wurden als positiv für anti-mAChR Antikörper angesehen.

2.5 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit der GraphPad prism Software durchgeführt. Hierbei wurde der zweiseitige nicht-parametrische Mann Whitney U Test bei Vergleichen zwischen den verschiedenen Mausstämmen verwendet. Ein $P \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. (* = $P \leq 0,05$, ** = $P \leq 0,01$ und *** = $P \leq 0,001$)

2.6 Allgemeine Labormaterialien

Verbrauchs-/Gebrauchsmaterial	Hersteller
Dialyseschlauch 3,5kDa	Thermo F.S.,IL,USA (Pierce)
Einfrierhilfe (Mr.Frosty)	Thermo F.S.,IL,USA
Einwegspritzen	BD,HD,DE
Filternutsche	C.Roth,KA,DE
Fuchs-Rosenthal-Kammer	Lo Laboroptik,Friedrichsdorf,DE
Glaswaren	C.Roth,KA,DE etc.
Guko-Manschetten	C.Roth,KA,DE
Kanülen	Braun,Melsungen,DE
Lanzetten	Biomedical Instruments,Zöllnitz,DE
LS Säulen	Miltenyi,GL,DE
Nitrocellulosemembran	Bio-Rad,M,DE
Ohrmarken	FST GmbH,HD,DE
Pipetten	Eppendorf,HH,DE
Plastikwaren	BD,HD,DE Eppendorf,HH,DE Sarstedt,Nürnberg,DE etc.
Präparierbesteck	FST GmbH,HD,DE
Vakuum-Saugflasche	C.Roth,KA,DE
Vivaspin20 Röhrchen 10kDa	Sartorius AG,GÖ,DE
Whatman®Paper	C.Roth,KA,DE
Western Blot Film	Sigma-Aldrich,M,DE (Kodak)
Zellsieb CellTrics®	Partec,Görlitz,DE
Zentrifugen-Röhrchen	Beckman Coulter,KR,DE

Tabelle 2.12: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Laborgeräte	Hersteller
Biophotometer	Eppendorf,HH,DE
Eismaschine	Scotsman,MI,I
Elektrophorese Kammer	Bio-Rad,M,DE
	Biometra,GÖ,DE
EMG-Gerät	Medtronic GmbH,Meerbusch,DE
Inkubator	Jouan/Nuaire,COTECH B,DE
Kühl-/Gefrierschränke	Liebherr,Ochsenhausen,DE
LSR II	BD,HD,DE
Magnetfeldrührer	Heidolph,Schwabach,DE
Mikroskop	Leica,WZ,DE
MRX-Reader	Dynex Technologies,Denkendorf,DE
pH-Meter	WTW,Weilheim,DE
QuadroMACS Separator	Miltenyi,GL,DE
Reinstwasseranlage	Merck,DA,DE (Millipore)
RotaRod	TSE,HG,DE
Schüttler	Biometra,GÖ,DE
	GFL,COTECH B,DE
Semidry Blotting Kammer	Bio-Rad,M,DE
Spannungsquelle	Bio-Rad,M,DE
Stabmixer	Unold AG,Hockenheim,DE
Sterilbank	Heraeus,B,DE
Stickstofftank	tec-lab,Taunusstein,DE
Thermoblock	Eppendorf,HH,DE
Ultrazentrifuge	Beckman Coulter,KR,DE
Vakuumpumpe	KNF Laboport
Vortex	SI,NY,USA
Waagen	Sartorius AG,GÖ,DE
Wärmeschränk	Infors AG,Bottmingen,CH
Wasserbad	GFL,COTECH B,DE
Western Blot Kamera	FLI,NY,USA
Zentrifugen	Eppendorf,HH,DE
	Hettich,TUT,DE
	Sigma,OHA,DE

Tabelle 2.13: Verwendete Laborgeräte

Antikörper	Konz.	Klon	Hersteller
α CHRNb	1:1000	EP2067Y	Genetex, CA, USA
α CHRNd	1:5000	88B	Abcam, Cambridge, UK
α -Hase IgG HRP	1:5000		GE Healthcare, FR, DE (Amersham)
α -Maus IgG AP	0.1 μ g/ml		Jackson, Suffolk, UK
α -Maus IgG HRP	1:5000		GE Healthcare, FR, DE (Amersham)

Tabelle 2.14: Verwendete Antikörper für den Western Blot und ELISA

Substanzen	Hersteller
α -Bungarotoxin (in PBS gelöst)	Merck, DA, DE (Calbiochem)
α -Cobrotoxin	Latoxan, Valence, F
Brefeldin A (in Ethanol gelöst)	Sigma-Aldrich, M, DE
Buprenorphin	RB Pharmaceuticals, Berkshire, UK
CFA	Sigma-Aldrich, M, DE
CNBr-aktivierte Sepharose 4B Beads	GE Healthcare, FR, DE
Detektionsreagenz Western Blot	PerkinElmer, HH, DE
Diphtherie Toxin (in PBS gelöst)	Merck, DA, DE (Calbiochem)
Ethanol	C.Roth, KA, DE
Foxp3 Fix/Perm	eBiosciences, F, DE
Ionomycin (in DMSO gelöst)	Sigma-Aldrich, M, DE
Isopropanol	C.Roth, KA, DE
Ketamin	Pharmacia GmbH, B, DE
PMA (in Ethanol gelöst)	Sigma-Aldrich, M, DE
SeaBlue®Plus2	Life techn., DA, DE (Invitrogen)
<i>torpedo californica</i>	Aquatic Research Consul., CA, USA
Xylazin	Bayer, LEV, DE

Tabelle 2.15: Verwendete Substanzen

Zellkulturmedien und -zusätze	Hersteller
Ampuwa® Wasser	Fresenius, Bad Homburg v.d.H., DE
DMSO	Sigma-Aldrich, M, DE
EL Puffer	Qiagen GmbH, Hilden, DE
Heparin	Sigma-Aldrich, M, DE
(10x) DPBS ohne Ca^{2+} , Mg^{2+}	Biochrom AG, B, DE
Trypanblau	Biochrom AG, B, DE
(10x) Trypsin/EDTA	Biochrom AG, B, DE
Türks-Lösung	Merck, DA, DE

Tabelle 2.16: Verwendete Zellkulturmedien und -zusätze

Kits	Hersteller
BCA Protein Assay Kit	Thermo F.S.,IL,USA (Pierce)
PageSilver TM Silver Staining Kit	Thermo F.S.,IL,USA (Fermentas)
PNPP Phosphatase Substrat Kit	Thermo F.S.,IL,USA (Pierce)

Tabelle 2.17: Verwendete Kits

Software	Hersteller
GraphPad prism	GraphPad,CA,USA
FACSDiva	BD,HD,DE
FlowJo	Treestar,OR,USA
Mendeley	Mendeley,London,UK
Microsoft Office	Microsoft,Unterschleißheim,DE
Latex	latex-project.org

Tabelle 2.18: Verwendete Software

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung des EAMG Mausmodells

Wie bereits unter 1.3. beschrieben eignet sich das Tiermodell der MG - genannt EAMG - hervorragend sowohl für die Untersuchung der Pathomechanismen, die der MG zu Grunde liegen als auch für die Entwicklung und Erprobung neuer Therapieansätze. Insbesondere das Mausmodell bietet durch die Verwendung verschiedener transgener Linien vielfältige Untersuchungsmöglichkeiten. In Kooperation mit Prof. S. Fuchs (Rehovot, Israel) wurde dieses Modell in unserem Labor etabliert.

3.1.1 Nachweis des *tAChRs* und des *mAChRs*

Ein erster wichtiger Schritt für die Etablierung des Modells stellte die erfolgreiche Aufreinigung des *tAChRs* dar, dessen spezifische Banden sich sowohl im Western Blot als auch in der dazugehörigen Silberfärbung abzeichnen (Abb. 3.1a). Die Aufreinigung erfolgte anhand des in 2.1. beschriebenen Protokolls. Der *tAChR* wurde für die EAMG Induktion, aber auch für den ELISA zur Detektion der Anti-*tAChR* Antikörper verwendet. Für den Nachweis von Anti-*mAChR* Antikörpern hingegen, wurde ein Zelllysats aus BC3H1-Zellen erzeugt (s. Gewinnung eines *mAChR* Lysats), das den *mAChR* enthielt (Abb. 3.1b).

Der AChR besteht aus 5UE, jeweils einer δ -UE, einer γ -UE, einer β -UE und zwei α -UE, die sich in der Silberfärbung des *tAChRs* durch insgesamt vier Banden darstellen. Die zwei α -UE verschmelzen in der Silberfärbung in Abb. 3.1a zu einer Bande, die deutlich stärker hervortritt. Für die Detektion der Banden im Western Blot wurden monoklonale Antikörper verwendet. Weder für den *tAChR* noch für den *mAChR* gab es kommerziell erhältlich einen Antikörper, mit denen alle UE des Rezeptors gleichzeitig hätten detektiert werden können. Deshalb beschränkt sich der Nachweis des Rezeptors in Abb. 3.1a auf die δ und die γ -UE und in Abb. 3.1b auf die β -UE. Für den Western Blot des *mAChR* wurde ein Gradienten-Gel verwendet anders als beim *tAChR*, was auch die unterschiedliche Laufstrecke der β -UE Bande erklärt. Beim *mAChR* handelt es sich um ein Lysat, d.h.

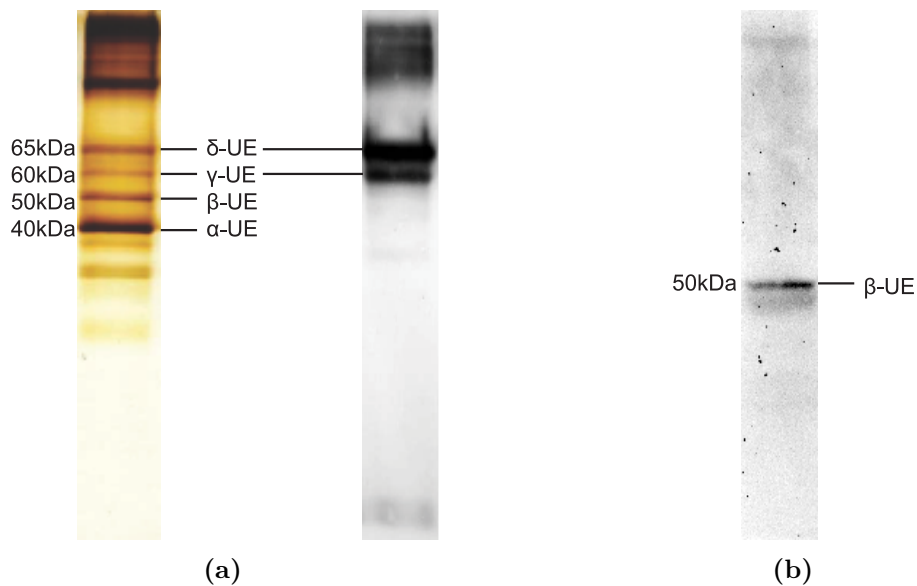


Abbildung 3.1: (a) Silberfärbung und Western Blot des *tAChRs* (12,5%iges Gel, Auftragung insgesamt 3 μg Gesamtprotein). Der *tAChR* stellt sich in der Silberfärbung durch vier Banden dar. Bei 65 kDa zeigt sich die δ -UE, bei 60 kDa die γ -UE, bei 50 kDa die β -UE und bei 40 kDa die α -UE des Rezeptors. Im Western Blot wurden die δ -UE und die γ -UE nachgewiesen. (b) Western Blot des *mAChRs* (Gradienten Gel 4-15%, Auftragung insgesamt 50 μg Gesamtprotein). Im Lysat des *mAChRs* wurde die β -UE des Rezeptors detektiert.

die Gesamtproteinmenge enthält hier nicht nur den *mAChR*, sondern auch noch andere Proteine der BC3H1-Zelllinie. Deshalb wurde auch deutlich mehr Gesamtprotein aufgetragen. Im Fall des *mAChR* stellte die Tatsache, dass es sich hierbei um ein Lysat handelte kein größeres Problem dar, da der *mAChR* für den ELISA mithilfe von α -Bungarotoxin spezifisch gebunden wurde und die restlichen Proteine der BC3H1-Zelllinie rausgewaschen wurden. Im Gegensatz dazu war es beim *tAChR* unerlässlich, dass dieser möglichst sauber aufgereinigt wurde, da er hauptsächlich für die Immunisierung der Mäuse verwendet wurde, aber auch für den *tAChR*-spezifischen ELISA. Die Nachweisgrenze der Silberfärbung lag bei 0.05 ng Protein, d.h. auch sehr geringe Verunreinigungen wären hier zu sehen.

3.1.2 Erfolgreiche EAMG Induktion in WT Mäusen

Zur Überprüfung der Wirksamkeit des aufgereinigten *tAChRs*, für die EAMG Induktion in WT Mäusen, wurden verschiedene Krankheitsparameter evaluiert und mit denen von WT Kontrollmäusen verglichen. Die Immunisierung der WT Mäuse mit dem aufgereinigten *tAChR* erfolgte analog des Protokolls unter 2.3.2.

86% der *tAChR*-immunisierten Mäuse zeigten nach drei Immunisierungen eine deutliche Muskelschwäche, die mithilfe des Paw Grip Tests validiert wurde (Tab. 3.1). Im Gegensatz dazu waren die Kontrollmäuse zum gleichen Zeitpunkt symptomfrei. Beim Paw Grip Test wird der Grad der Muskelschwäche vor und nach Anstrengung der Mäuse bestimmt. Die Muskelschwäche nimmt üblicherweise mit jeder Booster Immunisierung an Schwere zu.

Weiterhin konnte auch mittels ELISA ein signifikanter Unterschied der Anti-*tAChR*-Antikörperlevel zwischen immunisierten- und Kontrollmäusen festgestellt werden. Ein Vergleich des Gewichts, das in beiden Mausgruppen stetig anstieg und nur in Immunisierungsphasen eine Gewichtsreduktion aufwies (Daten nicht gezeigt), zeigte keinen Unterschied zwischen den Gruppen. Somit eignen sich sowohl der Paw Grip Test als auch der Nachweis der Anti-*tAChR* Antikörper für die Evaluation der Erkrankung. Außerdem konnte die Wirksamkeit des aufgereinigten *tAChR* für die EAMG Induktion demonstriert werden.

Mäuse	Mäuse/ Gruppe	Inzidenz in %	EAMG Stärke	OD ₄₀₅ Anti- <i>tAChR</i> IgG	Gewicht in g
WT	7	(6/7) 86%	3,00 (1,87)	1811 (129,3)	24,5 (1,3)
WT Ktr.	5	(0/5) 0%	0,00 (0)	130 (6,9)	24,4 (1,3)

Tabelle 3.1: Die Tabelle stellt den Vergleich zwischen *tAChR*-immunisierten WT Mäusen mit Kontrollmäusen anhand unterschiedlicher Krankheitsparameter nach einem Beobachtungszeitraum von 13 Wochen dar. In der Zeit wurde den Tieren dreimalig *s.c.* *tAChR*-injiziert. Für folgende Parameter wurde der Mittelwert (+SD) bestimmt: EAMG Stärke, OD₄₀₅Anti-*tAChR* IgG und Gewicht. Es sind die Ergebnisse eines Experiments gezeigt.

3.1.3 Nachweis der EAMG mittels EMG

Zur Evaluation der EAMG sollte als eine weitere Methode die EMG verwendet werden. Bei der EMG wird der *N.ischiadicus* durch eine Elektrode wiederholt stimuliert und im *M.gastrocnemius* abgeleitet. Die Amplituden eins und fünf der resultierenden Aktionspotentiale wurden miteinander verglichen. Bei einer 10%igen Abnahme von der ersten zur fünften Amplitude wird von einem sogenannten Dekrement gesprochen, welches die EAMG und die Myasthenia Gravis beim Menschen gleichermaßen kennzeichnet [55].

Die Messungen wurden jeweils wenige Tage vor dem Endpunkt des Experiments durchgeführt, zu einem Zeitpunkt an dem die EAMG Symptome mittels Paw Grip Test bei der Mehrheit der WT Mäuse detektierbar waren. Kontrolltiere zeigten zu keinem Zeitpunkt ein messbares Dekrement (Abb. 3.2a und b). Bei den *tAChR*-immunisierten Mäusen mit

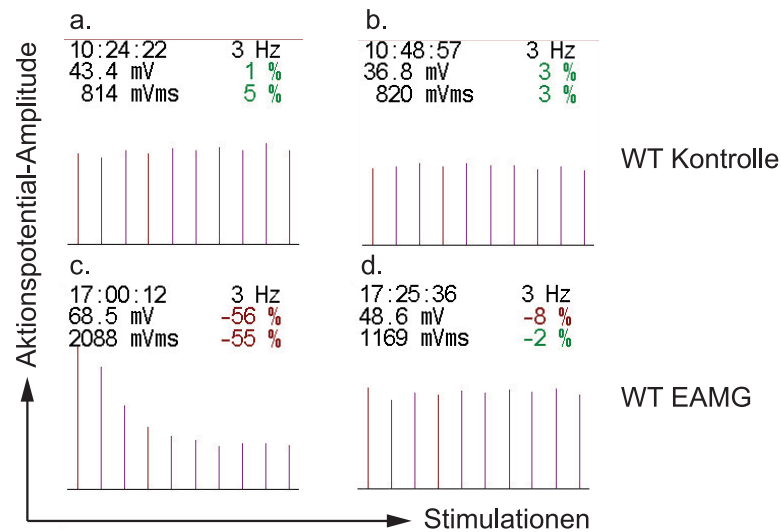


Abbildung 3.2: EMG Messungen für die Bestimmung der EAMG. Der Nerv *N.ischiadicus* der Mäuse wurde mit 3 Hz 10mal supramaximal stimuliert und der elektrische Impuls im *M.gastrocnemius* abgeleitet wie unter 2.3.3 beschrieben. Anschließend wurde die erste Amplitude des Aktionspotentials mit der 5. Amplitude verglichen. Die 10%ige Abnahme definiert dabei das Dekrement. Es wurden jeweils zwei repräsentative Messungen von verschiedenen Mäusen aus der WT- und Kontrollgruppe ausgewählt. Bei den WT EAMG Tieren ist die EMG-Messung einer Maus mit stark ausgeprägter Muskelschwäche (c) sowie einer Maus mit mildereren EAMG Symptomen (d) gezeigt.

einer stark ausgeprägten Muskelschwäche konnte ein deutliches Dekrement, wie in Abb. 3.2c gezeigt, gemessen werden. Während bei Mäusen mit mildereren EAMG Symptome, die im allgemeinen die Mehrheit bildeten, kein Dekrement nachgewiesen werden konnte, da es nicht zu einer 10%igen Abnahme von der ersten zur fünften Aktionspotential-Amplitude kam (Abb. 3.2d). Mithilfe der EMG ist es somit möglich die mit der EAMG einhergehende Muskelschwäche spezifisch zu detektieren, entsprechend der Myasthenie im Menschen. Jedoch scheint die Methode nicht sensitiv genug, um eine moderate Muskelschwäche in den Tieren nachweisen zu können.

Im Endeffekt wurde auf die EMG Messung als ergänzende Methode zur EAMG Evaluation verzichtet, da insbesondere bei Mäusen mit ausgeprägter, schwerer Muskelermüdung Narkosezwischenfälle auftraten und auf eine Betäubung während der Messung nicht verzichtet werden konnte.

3.1.4 Nachweis *tAChR*-spezifischer CD4⁺ T-Zellen

Ein weiterer Parameter zur Analyse der EAMG Pathogenese, sollte die Messung *tAChR*-spezifischer CD4⁺ T-Zellen beinhalten. Inwiefern sich diese im EAMG Modell durchflußzytometrisch analysieren lassen, sollten Stimulationsexperimente mit den, die Alpha-UE des *torpedo* Acetylcholinrezeptor umspannenden, Peptidpools (P1-P5) zeigen.

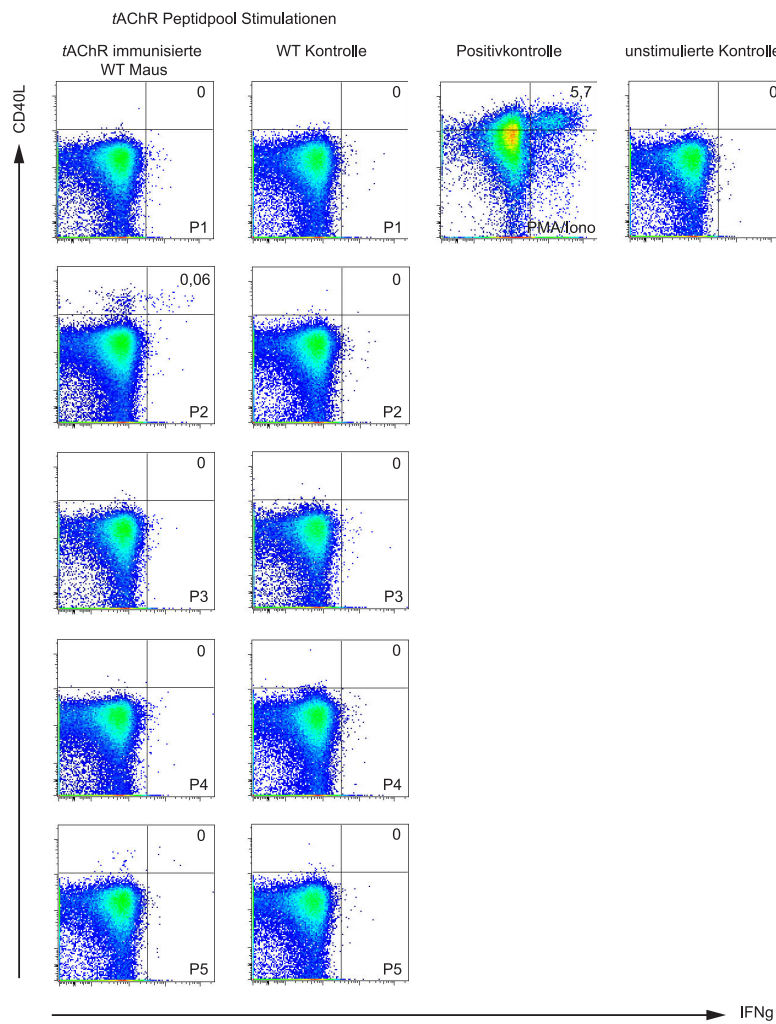


Abbildung 3.3: *tAChR* Peptidpool Stimulationen. Die Milzzellen einer *tAChR*-immunisierten WT Maus und einer Kontrollmaus wurden nach der 3.Immunisierung isoliert und mit den *torpedo* Acetylcholinrezeptor Peptidpools (P1-P5, hier je: 0.5 µg/ml) stimuliert. Dargestellt sind die IFNγ-produzierenden CD40L⁺CD4⁺ T-Zellen, die mithilfe der intrazellulären Zytokinfärbung analysiert wurden. Als Negativkontrolle diente eine unstimulierte Probe und als Positivkontrollen PMA/Ionomycin.

Dabei wurden sowohl Milzzellen von *tAChR*-immunisierten als auch von Kontrollmäusen stimuliert und die Frequenz Antigen-spezifischen $\text{IFN}\gamma$ -produzierenden CD4^+ T-Zellen detektiert. Der Marker CD40L definierte dabei die Antigen-aktivierten CD4^+ T-Zellen. Das Zytokin $\text{IFN}\gamma$ wurde stellvertretend für andere Zytokine für die Stimulationsexperimente gemessen. Zur Stimulation der Positivkontrolle wurde PMA/Ionomycin verwendet. Als Negativkontrolle diente eine unstimulierte Probe. Wie in Abb. 3.3 deutlich zu erkennen, lassen sich nur die *tAChR*-immunisierten Mäusen durch den Peptidpool P2 stimulieren nicht die Kontrolltiere. Allerdings zeigt auch keiner der anderen Peptidpools eine ähnliche Stimulation wie P2 bei den EAMG Mäusen. Dieses Resultat passt zu Beobachtungen verschiedener Studien [36, 122, 123], denn der Peptidpool P2 enthält das für das EAMG Mausmodell postulierte immundominante Epitop. Aus diesem Grund wurde in weiteren Stimulationsexperimenten ausschließlich der Peptidpool P2 verwendet.

3.1.5 Nachweis mAChR-spezifischer CD4^+ T-Zellen

Das sich Milzzellen von immunisierten WT Mäusen mit dem *tAChR* Peptidpool P2 stimulieren lassen wie in Abb. 3.3 zu sehen, wurde in Stimulationsexperimenten mit den verschiedenen *torpedo* Acetylcholinrezeptor Peptidpools (P1-P5) festgestellt. Aus diesem Grund wurden hier sowohl der *tAChR* Peptidpool P2 als auch PMA/Ionomycin als Positivkontrolle verwendet. Ob sich die Milzzellen auch mit Peptiden der α -Untereinheit des murinen Acetylcholinrezeptor stimulieren lassen würden, sollte mithilfe unterschiedlicher muriner Peptidpools (P1-P5) geklärt werden.

Nach der 3.Immunisierung wurden dafür von einer WT Maus Milzzellen isoliert und mithilfe intrazellulärer Zytokinfärbung durchflußzytometrisch analysiert. Während man bei der polyklonalen Stimulation eine Frequenz von 5,4% und bei der *tAChR*-spezifischen Stimulation eine Frequenz von 0,3% $\text{IFN}\gamma$ -produzierenden $\text{CD40L}^+\text{CD4}^+$ T-Zellen detektieren konnte (Abb. 3.4), wurden nach Stimulation mit den mAChR Peptiden keine $\text{IFN}\gamma$ -produzierenden $\text{CD40L}^+\text{CD4}^+$ T-Zellen gemessen. Dieses Ergebnis deckt sich auch mit Untersuchungen von Ostlie *et al.*[3]. Aus diesem Grund wurde in den folgenden Experimenten mit dem *tAChR* Peptidpool P2 stimuliert, jedoch keine zusätzliche Stimulation mit mAChR Peptiden durchgeführt.

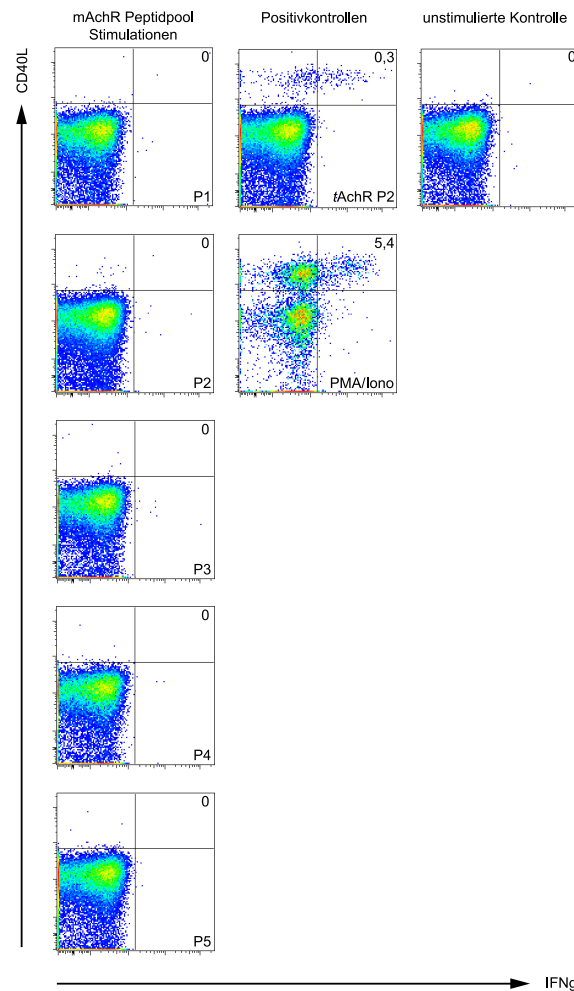


Abbildung 3.4: mAChR Peptidpool Stimulationen. Nach der 3.Immunisierung wurden die Milzzellen einer WT Maus isoliert und mit verschiedenen, die α -Untereinheit des murinen Acetylcholinrezeptor umspannenden, Peptidpools (P1-P5) stimuliert. Dargestellt sind die IFN γ -produzierenden CD40L⁺CD4⁺ T-Zellen, die mithilfe der intrazellulären Zytokinfärbung analysiert wurden. Als Negativkontrolle diente die unstimulierte Probe und als Positivkontrollen wurde PMA/Ionomycin und der *torpedo*AChR-spezifische Peptidpool (P2) verwendet.

3.2 Analyse der Rolle von TH17-Zellen in der Pathogenese der MG

TH17-Zellen sind in die Entstehung und Erhaltung entzündlicher Prozesse involviert und werden darüber hinaus mit dem Auftreten verschiedener Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht. Ihre Bedeutung im Bezug auf Autoantikörper-vermittelte Erkrankungen insbesondere für die Entwicklung der EAMG ist noch nicht endgültig geklärt. Das proinflammatorische Effektorzytokin der TH17-Zellen IL17, das diese TH-Zelluntergruppe charakterisiert, soll im Weiteren eingehender im Hinblick auf die Pathogenese der EAMG untersucht werden ebenso wie die TH17-Zellen selbst. Der Vergleich *tAChR*-immunisierter WT und IL17-defizienter Mäuse sollte dabei erste Hinweise liefern (Abb. 3.5).

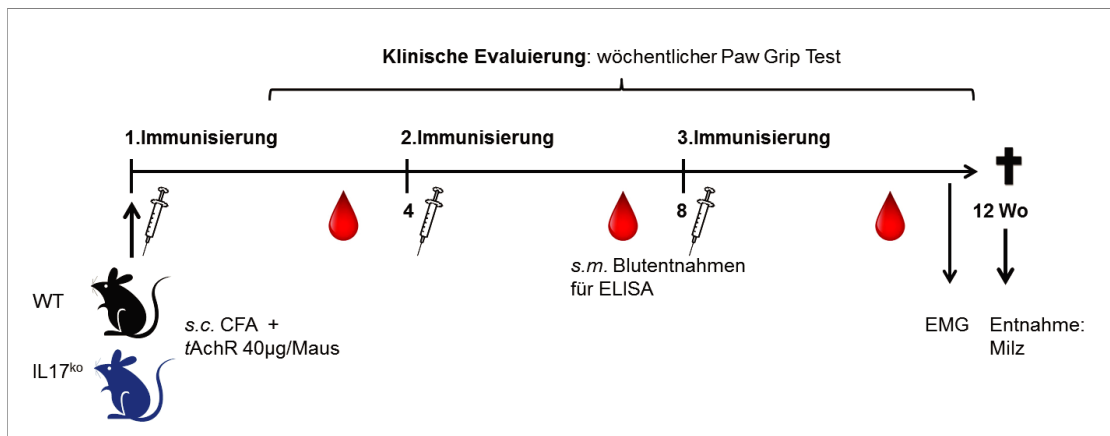


Abbildung 3.5: Experimenteller Plan zur Untersuchung der Bedeutung von TH17-Zellen für die EAMG mithilfe von IL17^{ko} Mäusen.

3.2.1 Verminderte EAMG Symptome in IL17^{ko} im Vergleich zu WT Mäusen

Zur Untersuchung der Bedeutung von IL17 für die Entwicklung der EAMG wurden WT und IL17^{ko} Mäuse mit *tAChR* in CFA immunisiert und deren Krankheitssymptome mithilfe des Paw Grip Tests evaluiert. Während einige wenige Mäuse nach der 2. Immunisierung erste Anzeichen für die Erkrankung erkennen ließen, treten die stärker ausgeprägten EAMG Symptome, erst nach der 3. Immunisierung deutlich zutage. Ein Ergebnis, das auch im Einklang mit den Beobachtungen von Wu *et al.* [55] steht. Die Ermüdung des Muskels betrifft nach drei Immunisierungen die Mehrheit der WT Mäuse wie aus Abb.

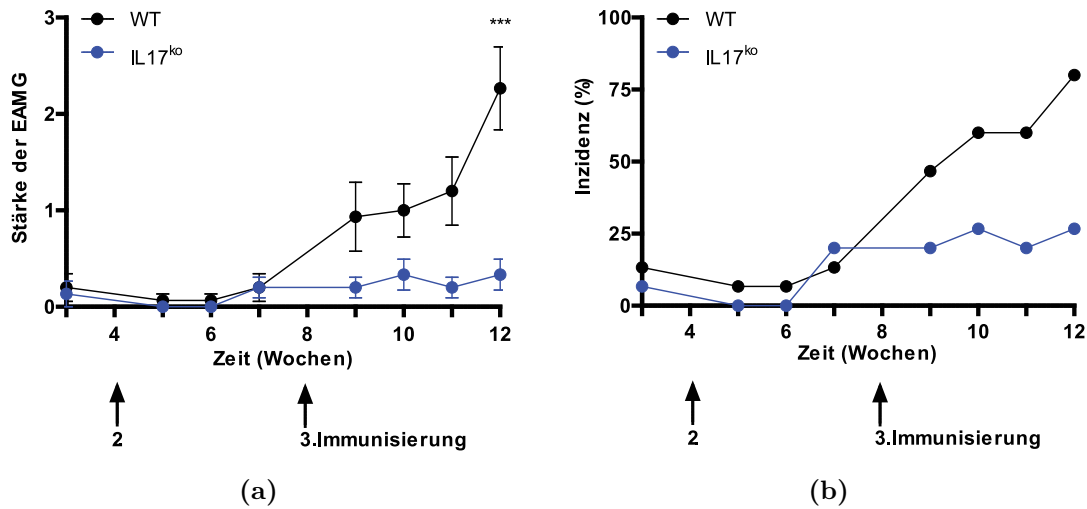


Abbildung 3.6: Vergleich der EAMG Stärke (a) und Inzidenz (b) zwischen WT (N=15) und IL17^{ko} (N=15) Mäusen. Der Nachweis der EAMG Symptome erfolgte mittels Paw Grip Test. Beide Parameter sind in den IL17^{ko} Mäusen reduziert. Die Krankheitsinduktion und Analyse erfolgte wie unter 2.3.2 und 2.5 beschrieben. In der Graphik sind die kumulativen Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt.

3.6 zu entnehmen ist, während die meisten der IL17^{ko} Mäuse symptomfrei bleiben. Nur bei etwa 25% der IL17^{ko} Mäuse konnte eine leichte Muskelschwäche detektiert werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass das Zytokin IL17 in die Pathogenese der EAMG involviert ist.

3.2.2 Generierung *tAChR*-spezifischer TH17-Zellen im Verlauf der Erkrankung

Um festzustellen, ob und mit welcher Kinetik *tAChR*-spezifische TH17-Zellen in WT Mäusen nach EAMG Induktion generiert werden, wurde zwei Wochen nach den entsprechenden Immunisierungen PBMCs isoliert und gepoolt. Die PBMCs wurden spezifisch stimuliert mit einem *tAChR* Peptidpool (P2), der die immundominanten *tAChR* 146-162 Peptide [36] enthielt. Im Anschluß wurde die resultierende *tAChR*-spezifische Zytokinproduktion mittels intrazellulärer Zytokinfärbung durchflußzytometrisch analysiert. CD40L diente dabei als Marker für antigenspezifisch aktivierte CD4⁺ T-Zellen [124].

Der Abb. 3.7 lässt sich entnehmen, dass bereits zwei Wochen nach der ersten Immunisierung *tAChR*-spezifische TH17-Zellen im Blut der WT Mäuse detektiert werden konnten. In diesem Experiment wurde nach der ersten Immunisierung eine Frequenz von

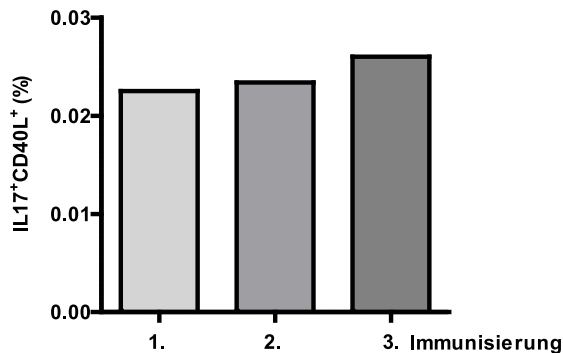


Abbildung 3.7: *tAChR*-spezifische TH17-Zellen im Krankheitsverlauf. Repräsentative Darstellung der intrazellulären Zytokinfärbung der gepoolten PBMCs nach Stimulation mit dem *tAChR* Peptidpool (P2), der den immundominanten Teil des Rezeptors beinhaltet. Die PBMCs wurden von WT Mäuse (N=10) jeweils 2 Wochen nach der jeweiligen Immunisierung isoliert. Die Graphik zeigt die Frequenz *tAChR*-spezifischer IL17⁺-produzierender CD4⁺ T-Zellen. Als Beispiel für die durchflußzytometrische Analyse finden sich die DotPlots zur 3.Immunisierung im Anhang (Abb. A1).

0,0225%, nach der zweiten eine von 0,0234% und nach der dritten eine von 0,026% *tAChR*-spezifischer IL17⁺-produzierender CD4⁺ T-Zellen gefunden. Obwohl die Zellen bei jeder der entsprechenden Messungen nachgewiesen wurden, kommt es zu keinem signifikanten Anstieg der *tAChR*-spezifischen TH17-Zellen im Blut der WT Mäuse nach den Booster Immunisierungen. In Kontrollmäusen wurden keine *tAChR*-spezifischen IL17⁺-produzierenden CD4⁺ T-Zellen nach spezifischer Stimulation (P2) beobachtet (hier nicht gezeigt).

3.2.3 Vergleichbare T-Zelldifferenzierung zwischen IL17^{ko} und WT Mäusen

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die T-Zelldifferenzierung aufgrund der IL-17 Defizienz beeinflusst wird. Dahingehend sollte sowohl die Zytokin-Produktion *tAChR*-spezifischer CD4⁺ T-Zellen als auch die Frequenz bestimmter Treg-Zellpopulationen in IL17^{ko} Mäusen untersucht und mit dem WT verglichen werden.

Quantifizierung der zytokin-produzierenden, *tAChR*-spezifischen CD4⁺ T-Zellen mittels intrazellulärer Zytokinfärbung

Inwiefern das Fehlen von IL17 einen Einfluss auf die T-Zellentwicklung bzw. -differenzierung im EAMG Model hat, sollte die Analyse der Generierung von *tAChR*-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in WT im Vergleich zu IL17^{ko} Mäusen zeigen. Dafür wurden nach der 3.Im-

munisierung Milzzellen isoliert und mit einem *tAChR* Peptidpool (P2), der die immun-dominanten *tAChR* 146-162 Peptide [36] enthielt, spezifisch stimuliert. PMA/Ionomycin wurde als Positivkontrolle verwendet. Eine Stimulation mit Peptiden des mAChR führte, wie unter 3.1.5 gezeigt, nicht zu einer spezifischen Immunantwort und wurde deshalb nicht weiterverfolgt.

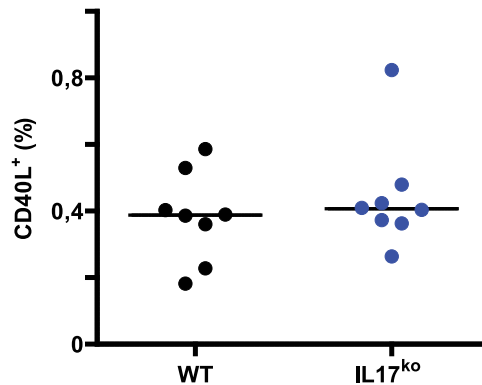


Abbildung 3.8: Frequenz *tAChR*-spezifische CD4⁺ T-Zellen. Nach der 3.Immunisierung wurden Milzzellen von immunisierten WT und IL17^{ko} Mäusen mit dem *tAChR* Peptidpool (P2) stimuliert und die antigenspezifische CD40L Expression wurde analysiert. Die Graphik zeigt den prozentualen Anteil der CD40L⁺CD4⁺ T-Zellen je WT Maus (N=8) und IL17^{ko} Maus (N=8). Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis eines Experiments von zwei unabhängigen Experimenten.

Die Frequenz der Antigen-aktivierten CD4⁺ T-Zellen wurde mithilfe des Markers CD40L in Anlehnung an Frentsch *et al.*[124] bestimmt. Außerdem wurde der prozentuale Anteil der *tAChR*-spezifischen CD4⁺ T-Zellen, die IFN γ , IL2 und IL21 produzieren, mithilfe der intrazellulären Zytokinfärbung quantifiziert. IL17 wurde, wie in Abb. 3.9 gezeigt, ebenfalls gefärbt. Erwartungsgemäß wurde von den IL17^{ko} Mäusen kein IL17 produziert. Beim Vergleich der WT Mäuse mit den IL17^{ko} Mäusen konnten keine weiteren signifikanten Unterschiede beobachtet werden. In beiden Mauslinien lag die Frequenz der *tAChR*-spezifischen CD4⁺ T-Zellen nach *ex vivo* Stimulation, definiert durch die Hochregulierung von CD40L, bei etwa 0,4% (Abb. 3.8).

Ähnlich verhält es sich beim Vergleich der prozentualen Anteile der Zytokin-produzierenden CD40L⁺CD4⁺ T-Zellen (Abb. 3.9). In beiden Mauslinien ließen sich deutlich höhere Frequenzen für CD4⁺ T-Zellen messen, die nach Stimulation mit dem *tAChR* Peptidpool IFN γ und IL2 exprimierten und in geringerem Maße IL21. Jedoch gab es im Vergleich zwischen den WT und IL17^{ko} Mäusen im Bezug auf die Frequenz der produzierten Zy-

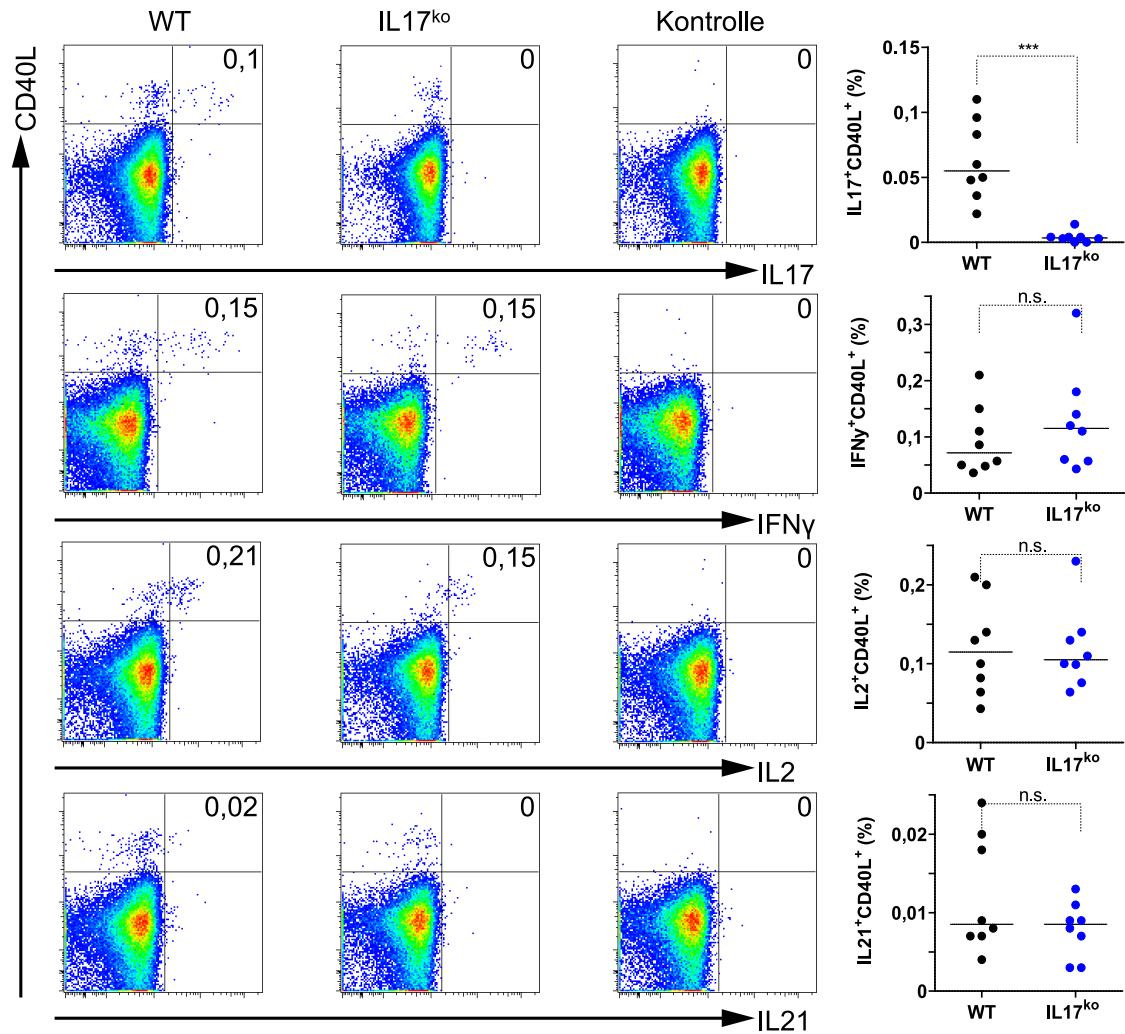


Abbildung 3.9: $tAChR$ -spezifische Zytokin-produzierende $CD4^+$ T-Zellen. Nach der 3. Immunisierung wurden Milzzellen von immunisierten WT und $IL17^{ko}$ Mäusen mit dem $tAChR$ Peptidpool (P2) stimuliert und die antigenspezifische Zytokin-Expression wurde analysiert. Die rechten Graphiken zeigen die Frequenz der $tAChR$ -spezifischen Zytokin-produzierenden $CD4^+$ T-Zellen je WT Maus (N=8) und $IL17^{ko}$ Maus (N=8). Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis eines Versuchs von zwei unabhängigen Experimenten. Die DotPlots auf der linken Seite zeigen die repräsentativen durchflußzytometrischen Analysen einer WT, einer $IL17^{ko}$ und einer Kontrollmaus bezüglich ihrer Zytokin-produzierenden antigenspezifisch-aktivierten $CD4^+$ T-Zellen nach P2-Stimulation.

tokine keine signifikanten Unterschiede. Außerdem konnte wie in Abb. 3.9 dargestellt, bei Kontrollmäusen keine spezifische Stimulation der *tAChR*-spezifischen CD4⁺ T-Zellen beobachtet werden.

Analyse der Treg-Zellen

Die Entwicklung von iTreg-Zellen ist reziprok mit der, der TH17-Zellen verknüpft. Welche Auswirkungen die EAMG Induktion auf die Population der Treg-Zellen insbesondere bei den IL17-defizienten Mäusen hat, sollte näher untersucht werden. Am Versuchsendpunkt wurden sowohl den *tAChR*-immunisierten WT als auch den IL17^{ko} Mäusen die Milz entnommen und die Treg-Zellen durchflußzytometrisch analysiert. Beim Vergleich der Frequenz aller FoxP3⁺ Treg-Zellen konnte in beiden Mauslinien kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 3.10a).

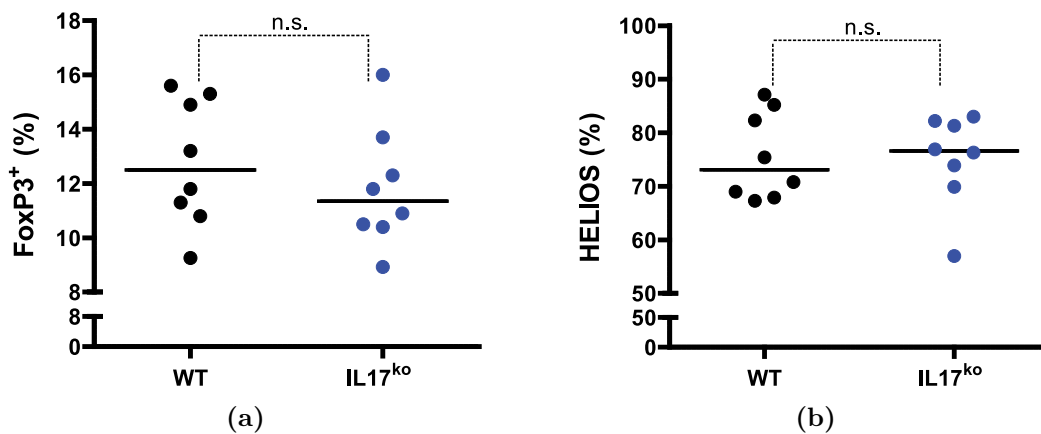


Abbildung 3.10: Analyse der Treg-Zellen von WT im Vergleich zu IL17^{ko} Mäusen nach der 3. Immunisierung. (a) Die Graphik stellt den prozentualen Anteil der FoxP3⁺CD4⁺ T-Zellen je WT Maus (N=8) und IL17^{ko} Maus (N=8) in der Milz dar. In Abb.(b) wurde die Frequenz der HELIOS⁺ Treg-Zellen analysiert. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse eines Versuchs von zwei unabhängigen Experimenten. Repräsentative DotPlots für die durchflußzytometrische Analyse befinden sich im Anhang (Abb. A2).

Eine weitere Klassifikation der Treg-Zellen erfolgte mithilfe des Markers HELIOS, der die Detektion von im Thymus differenzierten Tregs ermöglichen sollte. Mit annäherungsweise 70% der HELIOS⁺ Treg-Zellen decken sich die hier dargestellten Ergebnisse (Abb. 3.10b) mit denen von Thornton *et al.*[125]. Bei der Analyse der prozentualen Anteile, der aus dem Thymus stammenden HELIOS⁺ Treg-Zellen und der HELIOS⁻ iTregs konnten keine Unterschiede zwischen den WT und den IL17^{ko} Mäusen beobachtet werden.

Unter Berücksichtigung sowohl der Quantität und Qualität der T-Zellentwicklung bzw. -differenzierung als auch der Frequenz der Treg-Zellen in der EAMG, läßt sich zusammenfassend sagen, dass das Fehlen von IL17 hier zu keinem signifikanten Unterschied führt.

3.2.4 Detektion der Anti-AChR-spezifischen Antikörper bei IL17^{ko} im Vergleich zu WT Mäusen

Als nächstes wurde die Induktion der Anti-AChR-spezifischen Antikörper im Verlauf der EAMG untersucht. Von den beiden Mauslinien wurde jeweils 3 Wochen nach den Immunisierungen *s.m.* Blut abgenommen und analysiert. Nach der ersten Immunisierung waren bei der Mehrheit der Mäuse bereits geringe Level an Anti-*t*AChR Antikörper detektierbar, die mit den folgenden Booster Immunisierungen weiter anstiegen.

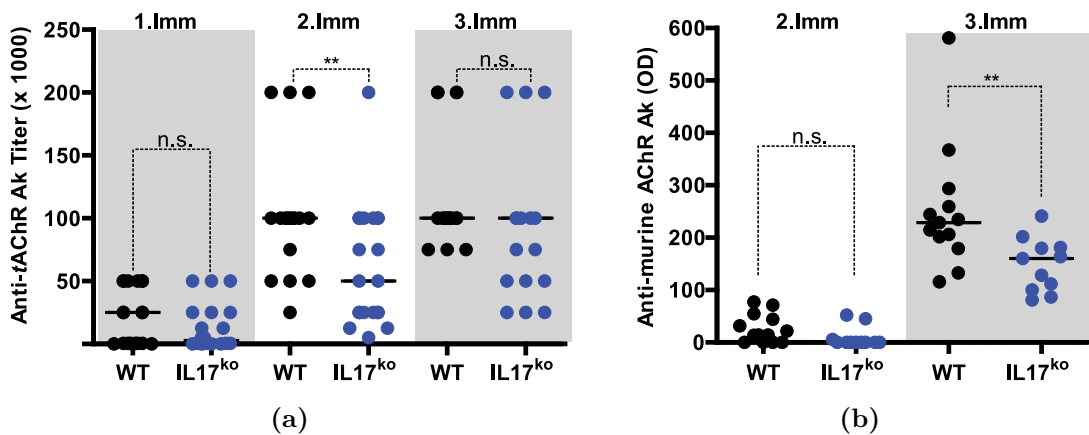


Abbildung 3.11: (a) Anti-*t*AChR-Antikörpertiter und (b) Anti-mAChR Antikörperlevel von *t*AChR-immunisierten WT und IL17-defizienten Mäusen. Von den Mäusen wurde jeweils 3 Wochen nach den Immunisierungen *s.m.* Blut abgenommen, das hinsichtlich spezifischer Antikörper analysiert wurde. In Abb.(a) ist der Anti-*t*AChR-Antikörpertiter nach wiederholten Immunisierungen für die WT (N=19) und IL17^{ko} Mäuse (N=20) dargestellt. Rechts (b) ist der Anti-mAChR Antikörperlevel nach der zweiten und dritten Immunisierung gezeigt (N=13 für WT Mäuse und N=11 für IL17^{ko} Mäuse). Die Ergebnisse von wenigsten 2 unabhängigen Experimenten wurden hier gepoolt.

Nur nach der 2.Immunisierung konnte ein signifikant geringerer Anti-*t*AChR Antikörpertiter bei den IL17^{ko} Mäusen beobachtet werden - eine Phase, in der selbst die WT Mäuse nur geringe EAMG Symptome aufwiesen. Nach der 3.Immunisierung war dieser signifikante Unterschied jedoch nicht mehr nachweisbar (Abb. 3.11a). Im Gegensatz dazu wurden im Bezug auf die Autoantikörper, die sich gegen den murinen, den wohl pathoge-

nen, AChR richten, bei WT im Vergleich zu IL17-defizienten Mäusen signifikant höhere Antikörperlevel nach der 3. Immunisierung gemessen (Abb. 3.11b). Ein Ergebnis, das mit der Entwicklung von EAMG Symptome in WT Mäusen korreliert, während die IL17^{ko} Mäuse weitestgehend unbeeinträchtigt blieben (Abb. 3.6). Diese Beobachtung deutet auf einen Einfluß des Zytokins IL17 auf die Produktion autoreaktiver, pathogener Antikörper hin.

3.3 Essentielle Rolle der TH17-Zellen für die Induktion der EAMG

Bisher konnte gezeigt werden, dass IL17 in die Pathogenese der EAMG involviert ist und das *tAChR*-spezifische TH17-Zellen in immunisierten Mäusen generiert werden.

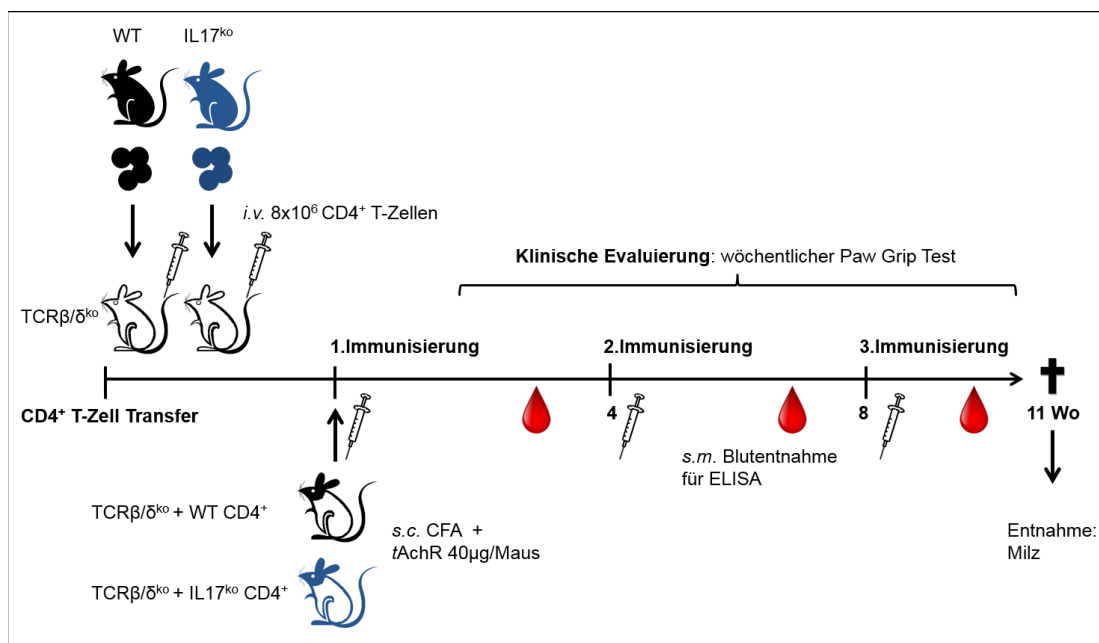


Abbildung 3.12: Experimenteller Plan zur Untersuchung der Bedeutung von TH17-Zellen für die EAMG mithilfe von TCRβ/δ^{ko} Mäusen.

Allerdings konnte nicht ausgeschlossen werden, dass anderen Zelltypen, wie B- und NK-Zellen oder CD8⁺-, NK- und γ/δ T-Zellen, die ebenfalls in der Lage sind IL17 zu produzieren [68, 102–106], von Bedeutung für das Krankheitsentstehen sind. Um die Relevanz der TH17-Zellen für die EAMG zu klären, wurden TCRβ/δ^{ko} Empfänger-Mäusen,

die über keinen funktionalen T-Zellrezeptor und damit auch über keine T-Zellen verfügen, $CD4^+$ T-Zellen von WT oder $IL17^{ko}$ Mäusen injiziert (Abb. 3.12). Diese wurden schließlich mit *tAChR*-immunisiert und die EAMG Symptome wurden evaluiert.

3.3.1 Analyse des adoptiven $CD4^+$ T-Zell-Transfers in $TCR\beta/\delta^{ko}$ Mäuse

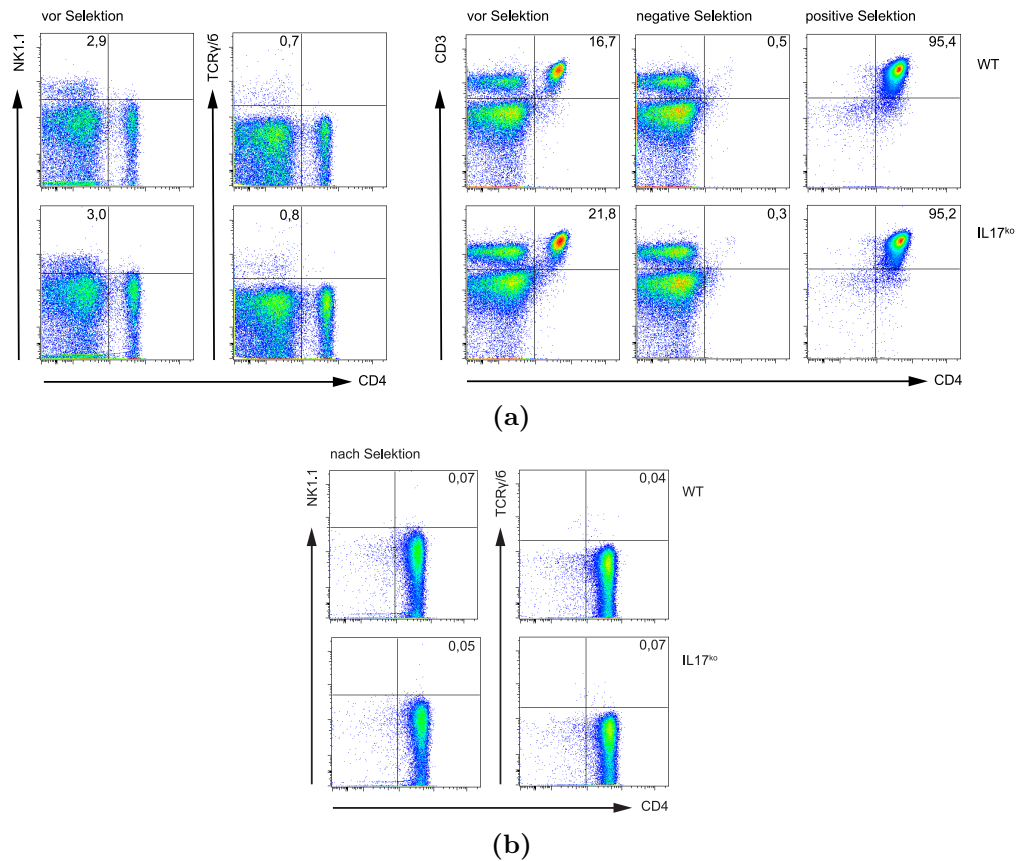


Abbildung 3.13: Dargestellt sind die Dotplots der durchflußzytometrisch analysierten Milzzellen von WT und $IL17^{ko}$ Mäusen vor dem adoptiven Transfer in die $TCR\beta/\delta^{ko}$ Mäuse. In Abb. (a) auf der linken Seite ist der prozentuale Anteil der NK-Zellen, γ/δ -Zellen und $CD4^+$ T-Zellen vor der Selektion mittels MACS gezeigt und in Abb. (b) nach der Selektion. Das Ergebnis der $CD4^+$ T-Zell-Analyse nach der Selektion ist auf der rechten Seite in Abb. (a) zu sehen. Zuerst ist die negative Fraktion gezeigt und schließlich die positive, transferierte Fraktion.

Die für den adoptiven Transfer benötigten $CD4^+$ T-Zellen wurden aus den Milzen von WT und $IL17^{ko}$ Mäusen mithilfe der MACS Technologie isoliert. Die Reinheit der isolierten $CD4^+$ T-Zellen lag sowohl bei den WT als auch bei den $IL17^{ko}$ Mäusen bei über

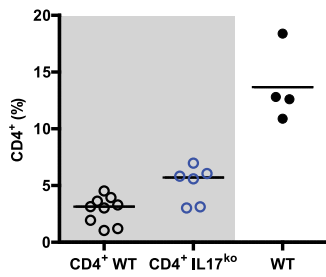


Abbildung 3.14: Durchflußzytometrische Analyse des $CD4^+$ T-Zellkompartiments in $TCR\beta/\delta^{ko}$ Mäusen mit transferierten WT (N=9) und $IL17^{ko}$ (N=6) $CD4^+$ T-Zellen im Vergleich zu WT Mäusen (N=4). Die Datenerhebung erfolgte am Versuchsendpunkt aus den Milzen der jeweiligen Tiere. Darstellung eines Experiments.

95% (Abb. 3.13). Die $CD4^+$ T-Zellen wurden im Anschluß an die durchflußzytometrische Analyse den $TCR\beta/\delta^{ko}$ Mäusen *i.v.* in die Schwanzvene injiziert. Darüber hinaus wurden sowohl die Oberflächenmarker NK1.1 und $TCR\gamma/\delta$ gefärbt, um ausschließen zu können, dass NK- als auch γ/δ T-Zellen, die ebenfalls IL17 produzieren können, mit transferiert werden (Abb. 3.13).

Am Versuchsendpunkt wurden schließlich die $CD4^+$ T-Zellen nochmal analysiert. Wie in Abb. 3.14 gezeigt, ist das $CD4^+$ T-Zellkompartiment von dem mit WT $CD4^+$ T-Zellen rekonstituierten $TCR\beta/\delta^{ko}$ Mäusen ähnlich dem mit $IL17^{ko}$ $CD4^+$ T-Zellen rekonstituierten. In der Tendenz ist der prozentuale Anteil des $CD4^+$ T-Zellkompartiment der $IL17^{ko}$ $CD4^+$ T-Zell transferierten $TCR\beta/\delta^{ko}$ Mäuse sogar höher als der Anteil der WT $CD4^+$ T-Zell transferierten.

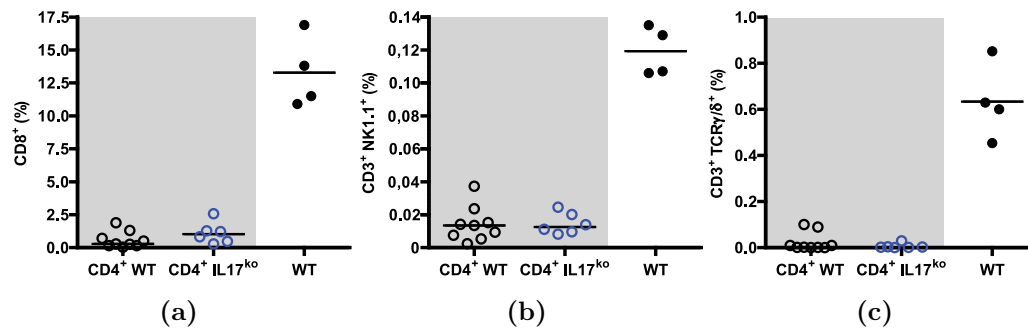


Abbildung 3.15: Durchflußzytometrische Analyse der CD8- (a), NK- (b) und γ/δ T-Zellen (c) nach dem adoptiven $CD4^+$ T-Zell-Transfer in $TCR\beta/\delta^{ko}$ Mäuse. Im Vergleich WT Mäuse (N=9) und $TCR\beta/\delta^{ko}$ Mäuse mit transferierten WT (N=9) und $IL17^{ko}$ (N=6) $CD4^+$ T-Zellen. Die Datenerhebung erfolgte am Versuchsendpunkt aus den Milzen der Mäuse. Darstellung eines Experiments.

Um eine Verunreinigung mit CD8, NK- und γ/δ T-Zellen ausschließen zu können, wurde am Versuchsendpunkt die Frequenz der potentiell IL17-produzierenden Zelltypen in den $TCR\beta/\delta^{ko}$ Mäusen gemessen und mit der Frequenz in WT Mäusen verglichen. Das Re-

sultat ist in Abb. 3.15 dargestellt. Für die zwei Tiere, die in den mit WT $CD4^+$ T-Zellen rekonstituierten $TCR\beta/\delta^{ko}$ Mäusen einen etwas höheren prozentualen Anteil (Abb. 3.15b und 3.15c) einnehmen im Vergleich zu den anderen Mäusen derselben Gruppe, findet sich kein Zusammenhang hinsichtlich der Stärke der EAMG Induktion.

3.3.2 Rolle von TH17-Zellen: Analyse der, mit $IL17^{ko}$ und WT $CD4^+$ T-Zellen rekonstituierten, $TCR\beta/\delta^{ko}$ Mäuse

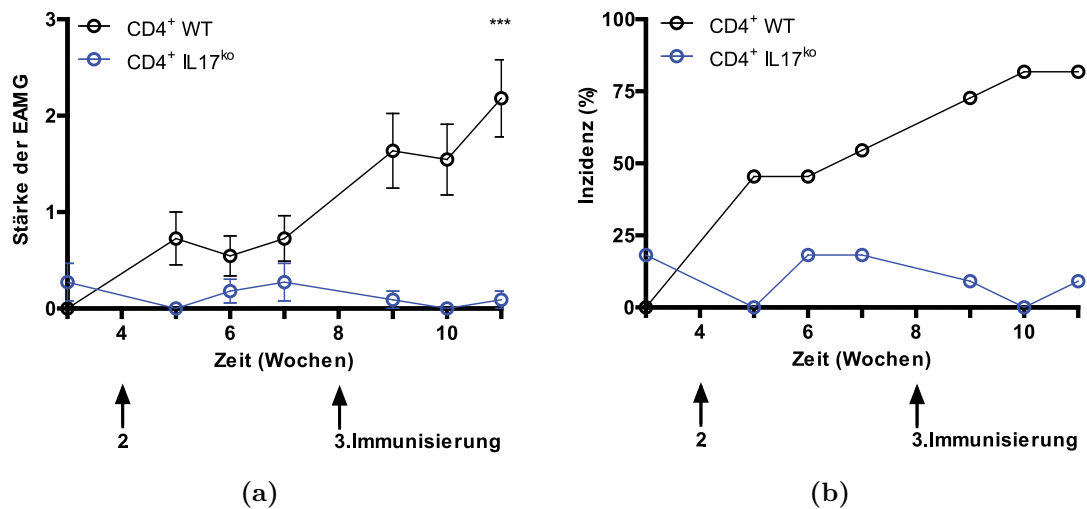


Abbildung 3.16: Vergleich der EAMG Stärke (a) und Inzidenz (b) zwischen WT (N=11) und $IL17^{ko}$ (N=11) Mäusen. Beide Parameter sind in den $IL17^{ko}$ Mäusen reduziert. Die Krankheitsinduktion und Analyse erfolgte wie unter 2.3.2 und 2.5 beschrieben. In der Graphik sind die kumulativen Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Drei Wochen nach dem adoptiven Transfer wurde die EAMG wie bereits beschrieben in den $CD4^+$ T-Zell rekonstituierten $TCR\beta/\delta^{ko}$ Mäusen induziert. Die Evaluation der Krankheitsausprägung erfolgte wieder mittels Paw Grip Test. In $TCR\beta/\delta^{ko}$ Mäusen mit transferierten WT $CD4^+$ T-Zellen konnte die EAMG in ähnlichem Maße induziert werden wie vorher in WT Mäusen. Sowohl in den WT als auch in den WT $CD4^+$ T-Zell rekonstituierten $TCR\beta/\delta^{ko}$ Mäusen zeigten sich bei der Mehrheit der Mäuse die stärker ausgeprägten Symptome einer belastungsabhängigen Muskelschwäche erst nach der dritten Immunisierung. Im Gegensatz dazu wurden bei Mäusen, die mit $IL17^{ko}$ $CD4^+$ T-Zellen rekonstituiert wurden, signifikant geringere Anzeichen von EAMG beobachtet - wie bereits bei den $IL17$ -defizienten Mäusen (Abb. 3.16 und Abb. 3.6).

Die Quantität und Qualität der T-Zellentwicklung bzw. -differenzierung nach *tAChR*

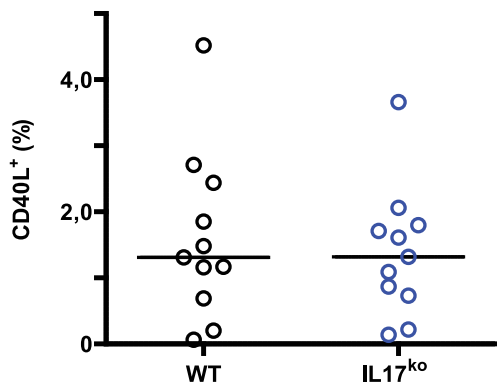


Abbildung 3.17: Frequenz *tAChR*-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen. Nach der 3.Immunisierung wurden Milzzellen von immunisierten $TCR\beta/\delta^{ko}$ Mäusen rekonstituiert mit WT oder $IL17^{ko}$ $CD4^+$ T-Zellen mit dem *tAChR* Peptidpool (P2) stimuliert und analysiert. Die Graphik zeigt den prozentualen Anteil der $CD40L^+CD4^+$ T-Zellen je WT (N=11) und je $IL17^{ko}$ $CD4^+$ T-Zell-transferierter Maus (N=11). Die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten wurden hier gepoolt.

Immunisierung war in beiden rekonstituierten Mäusen nicht signifikant unterschiedlich, außer im Hinblick auf die fehlende IL17 Produktion bei *tAChR*-stimulierter $CD4^+$ T-Zellen von $TCR\beta/\delta^{ko}$ Mäusen mit transferierten Zellen von $IL17^{ko}$ Mäusen (Abb. 3.17 und Abb. 3.18). Zu den untersuchten Zytokinen zählten außer IL17 noch IL2, $IFN\gamma$ und IL21.

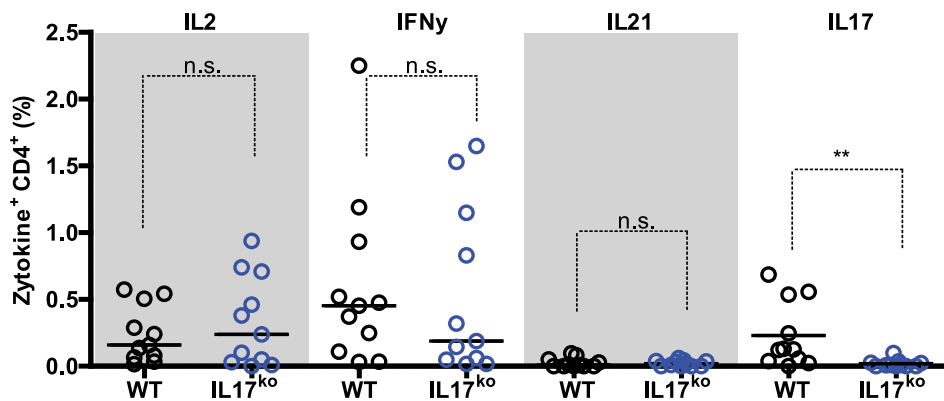


Abbildung 3.18: Zytokin⁺*tAChR*-spezifische $CD4^+$ T-Zellen. Nach der 3.Immunisierung wurden Milzzellen von immunisierten $TCR\beta/\delta^{ko}$ Mäusen transferiert mit WT oder $IL17^{ko}$ $CD4^+$ T-Zellen mit dem *tAChR* Peptidpool (P2) stimuliert und die antigenspezifische CD40L Expression wurde analysiert. Die Graphik zeigt die Frequenz der *tAChR*-spezifischen Zytokin-produzierenden $CD4^+$ T-Zellen je je WT $CD4^+$ T-Zell-transferierter Maus (N=11) und $IL17^{ko}$ $CD4^+$ T-Zell-transferierter Maus (N=11). Die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten wurden hier gepoolt. Repräsentative DotPlots für die durchflußzytometrische Analyse befinden sich im Anhang (Abb. A3).

Außerdem gab es keinen Unterschied beim Vergleich des Anti-*tAChR* Antikörpertiters zwischen den $TCR\beta/\delta^{ko}$ Mäusen mit transferierten WT $CD4^+$ T-Zellen oder denen mit transferierten $IL17^{ko}$ $CD4^+$ T-Zellen. Es konnten jedoch bezüglich der Anti-murinen AChR Antikörper signifikant geringere Level, für die mit $IL17$ -defizienten $CD4^+$ T-Zellen rekon-

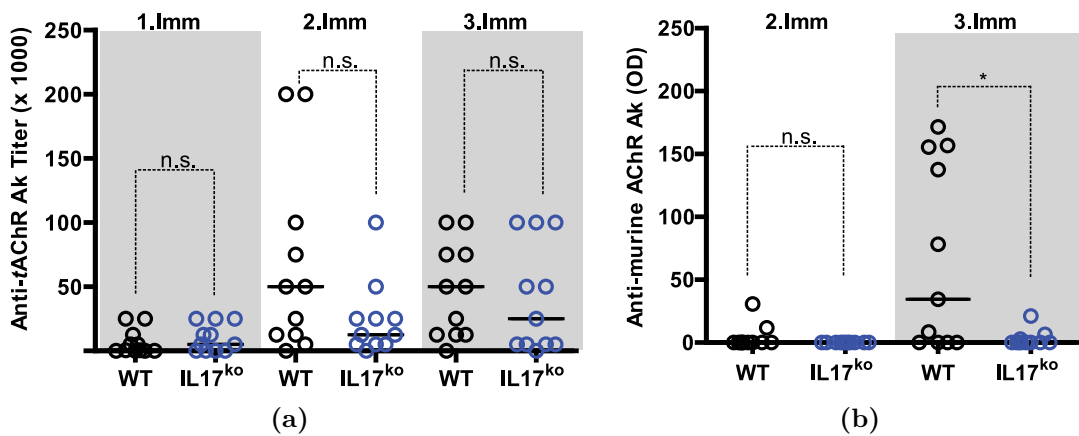


Abbildung 3.19: (a) Anti-*tAChR*-Antikörpertiter und (b) Anti-*mAChR* Antikörperlevel von *tAChR*-immunisierten $\text{TCR}\beta/\delta^{\text{ko}}$ Mäusen transferiert mit WT oder IL17^{ko} CD4⁺ T-Zellen. Von den Mäusen wurde jeweils 3 Wochen nach den Immunisierungen *s.m.* Blut abgenommen, das hinsichtlich spezifischer Antikörper analysiert wurde. In Abb.(a) ist der Anti-*tAChR*-Antikörpertiter nach wiederholten Immunisierungen für die WT-transferierten (N=11) und die IL17^{ko}-transferierten Mäuse (N=11) dargestellt. Rechts (b) ist der Anti-*mAChR* Antikörperlevel nach der zweiten und dritten Immunisierung gezeigt (N=11 für WT-transferierte Mäuse und N=11 für IL17^{ko}-transferierte Mäuse). Die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten wurden hier gepoolt.

stituierten Mäusen, festgestellt werden (Abb. 3.19).

Insgesamt bestätigen diese Ergebnisse die Beobachtungen aus dem Vergleich der IL17^{ko} Mäuse mit den WT Mäusen und darüber hinaus sprechen sie für eine wichtige Rolle der TH17-Zellen für die Pathogenese der EAMG.

3.4 Analyse der Relevanz von Treg-Zellen für die EAMG

Induktion

Wie bereits erwähnt, ist die Entwicklung der TH17-Zellen eng mit der Entwicklung der iTreg-Zellen vernetzt und obwohl das Fehlen von IL17 auf die Treg-Zellen anscheinend keine Auswirkung hat, könnte wiederum das Fehlen von regulatorischen T-Zellen die TH17-Zellen und damit auch den EAMG Krankheitsverlauf beeinflussen. Dieser Frage sollte mithilfe sogenannter DERE^g Mäuse nachgegangen werden, die eine temporäre Depletion der Treg-Zellen erlaubten (Abb. 3.20). Die Depletion der Treg-Zellen erfolgte vor der ersten Immunisierung und betrifft aufgrund ihrer temporären Natur somit vor allem die Induktionsphase der EAMG.

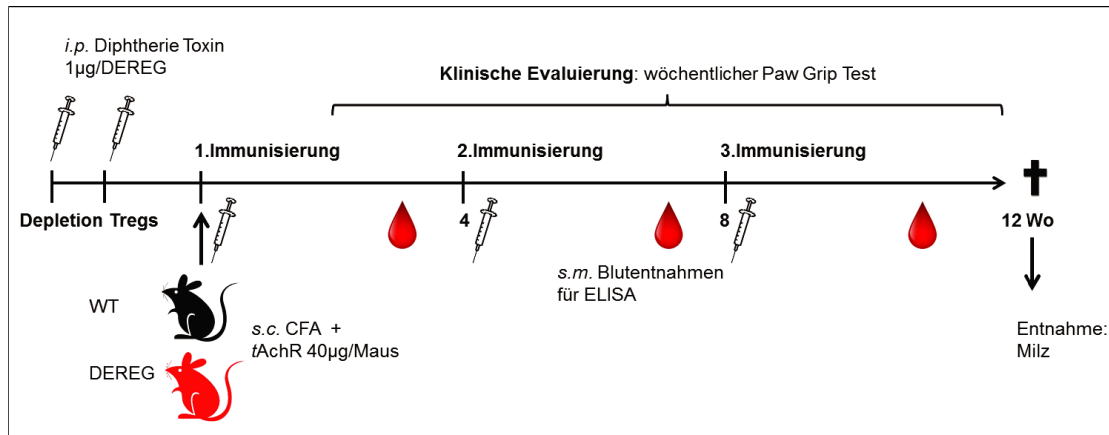


Abbildung 3.20: Experimenteller Plan zur Untersuchung der Bedeutung von Treg-Zellen für die EAMG mithilfe von DERE Mäusen. Die Depletion erfolgte an zwei aufeinanderfolgenden Tagen direkt vor der 1. Immunisierung.

3.4.1 Depletion von Treg-Zellen in DERE Mäusen

Zur Depletion von Treg-Zellen wurde DERE Mäusen *i.p.* DT injiziert (Abb. 3.21A und C). Das DTR-eGFP Fusionsprotein, das die DERE Mäuse unter der Kontrolle des Foxp3-Promotors exprimieren, ließ sich im FITC-Kanal durchflußzytometrisch analysieren (Abb. 3.21A und B). Die Abb. 3.21 zeigt am Beispiel einer DT-depletierten und einer nicht-depletierten DERE Maus, die spezifische Depletion der Foxp3⁺CD4⁺ T-Zellen im Blut.

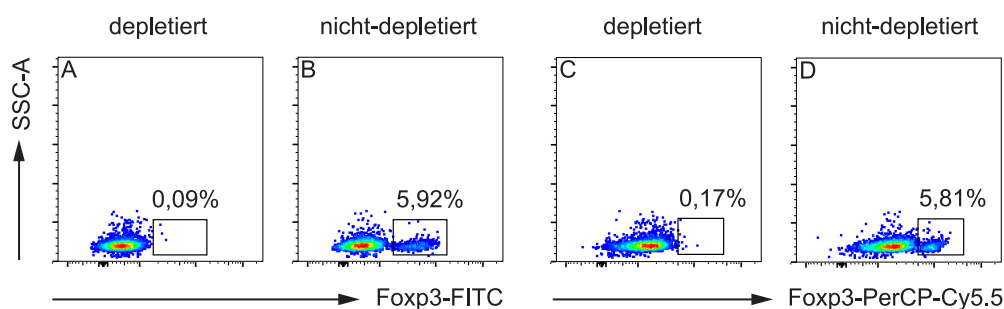


Abbildung 3.21: Depletion von Foxp3⁺CD4⁺ T-Zellen im Blut am Beispiel von einer DT-depletierten und einer nicht-depletierten DERE Maus. In A und B sind die Transgen⁺ Treg-Zellen dargestellt und in C und D alle Treg-Zellen im Blut.

3.4.2 Analoge EAMG Symptome in DEREГ im Vergleich zu WT Mäusen

Zur Analyse der Rolle der Treg-Zellen für die EAMG Induktion wurden WT Mäuse und Treg-Zell-depletierte DEREГ Mäuse wie in Abb. 3.20 gezeigt, mit *tAChR* in CFA immunisiert. Die EAMG Symptome wurden mithilfe des Paw Grip Tests im Verlauf der Erkrankung untersucht. Wie bei den WT Tieren nimmt die Muskelschwäche bei dem DEREГ Mäusen mit der Zeit zu und es kommt in beiden Mauslinien zu einem deutlichen Anstieg der EAMG-Stärke nach der 3. Immunisierung. Jedoch gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen den WT und DEREГ Mäusen.

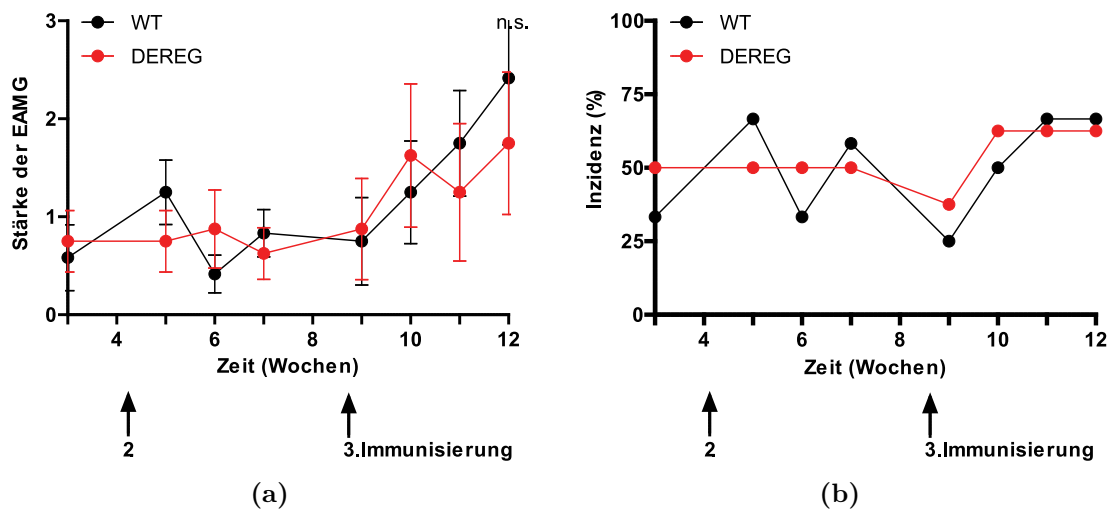


Abbildung 3.22: Vergleich der EAMG Stärke (a) und Inzidenz (b) zwischen WT (N=12) und DEREГ (N=8) Mäusen. Die Krankheitsinduktion und Analyse erfolgte wie unter 2.3.2 und 2.5 beschrieben. In der Graphik sind die kumulativen Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Die Krankheitsinzidenz hingegen ist schwierig zu interpretieren, da bei einem erheblichen Teil der Tiere sowohl in der WT- als auch in der DEREГ-Gruppe von Beginn an eine, wenn auch relativ gering ausgeprägte, Muskelschwäche vorhanden war. Letztendlich lässt sich beim Vergleich der DEREГ Mäuse mit den WT Mäusen zusammenfassend sagen, dass kein signifikanter Unterschied aufgrund der anfänglich depletierten Treg-Zellen zu beobachten ist.

3.4.3 Vergleichbare T-Zelldifferenzierung zwischen DEREK und WT Mäusen

Ob die Depletion der regulatorischen T-Zellen bei den DEREK Mäusen zu einer, von den WT Mäusen abweichenden, T-Zelldifferenzierung führt, sollte die Untersuchung der *tAChR*-spezifischen $CD4^+$ T-Zellen klären.

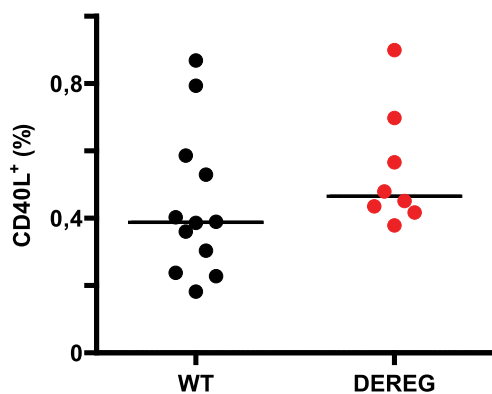


Abbildung 3.23: *tAChR*-spezifische $CD4^+$ T-Zellen. Nach der 3.Immunisierung wurden Milzzellen von immunisierten WT und DEREK Mäusen mit dem *tAChR* Peptidpool (P2) stimuliert und die antigenspezifische CD40L Expression wurde analysiert. Die Graphik zeigt den prozentualen Anteil der $CD40L^+CD4^+$ T-Zellen je WT Maus (N=12) und DEREK Maus (N=8). Dargestellt sind die gepoolten Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten.

Nach der 3.Immunisierung wurden deshalb die Milzzellen, der *tAChR*-immunisierten WT und DEREK Mäuse, isoliert und mit dem *tAChR*-Peptidpool (P2) stimuliert. Anschließend wurden die *tAChR*-spezifischen $CD4^+$ T-Zellen analysiert und deren Produktion der Zytokine IL17, $IFN\gamma$ und IL21 quantifiziert.

Beim Vergleich der Frequenzen der antigenspezifisch-aktivierten $CD4^+$ T-Zellen, gekennzeichnet durch den Aktivierungsmarker CD40L, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen DEREK und WT Mäusen nachgewiesen werden. Der prozentuale Anteil der $CD40L^+CD4^+$ T-Zellen lag wie bei dem Experiment mit den $IL17^{ko}$ Mäusen bei etwa 0,4% bei beiden Mauslinien (Abb. 3.23).

Das Gleiche galt für die *tAChR*-spezifischen $CD4^+$ T-Zellen hinsichtlich ihrer IL17, $IFN\gamma$ und IL21 Zytokin-Expression. Auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede detektiert werden. Allerdings ließ sich in der Tendenz eine höheren Produktion von IL17 und $IFN\gamma$ unter den *tAChR*-spezifischen $CD4^+$ T-Zellen der DEREK Mäuse im Vergleich zu denen der WT Mäuse beobachten. Für die zwei WT Mäuse, die in Abb. 3.24 eine höhere Frequenz $Zytokin^+CD40L^+CD4^+$ T-Zellen zeigen im Vergleich zu der anderer WT Mäuse der Gruppe, lässt sich kein Zusammenhang mit der Erkrankungsstärke herstellen.

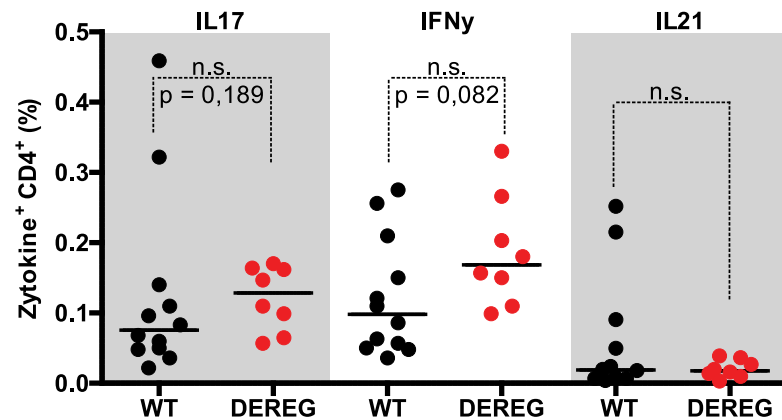


Abbildung 3.24: Zytokin-produzierende *tAChR*-spezifische CD4⁺ T-Zellen. Nach der 3. Immunisierung wurden Milzzellen von immunisierten WT und DERE Mäusen mit dem *tAChR* Peptidpool (P2) stimuliert und die antigenspezifische Zytokin-Expression wurde analysiert. Die Graphik zeigt den prozentualen Anteil der Zytokin⁺CD40L⁺CD4⁺ T-Zellen je WT Maus (N=12) und DERE Maus (N=8). Dargestellt sind die gepoolten Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten. Repräsentative DotPlots für die durchflußzytometrische Analyse befinden sich im Anhang (Abb. A4).

3.4.4 Detektion der AChR-spezifischen Antikörper bei DERE im Vergleich zu WT Mäusen

Zum Nachweis Anti-AChR-spezifischer Antikörper in DERE und WT Mäusen wurde in gleichen Abständen nach den jeweiligen Immunisierungen von den Mäusen Blut abgenommen. Die Proben der einzelnen Mäuse wurden auf Anti-*tAChR*- Antikörper hin untersucht und in einem Teil auf Anti-mAChR Antikörper. Insgesamt betrachtet, nimmt die Menge der Anti-*tAChR* Antikörper wie bereits gezeigt mit den Booster Immunisierungen zu. Jedoch gibt es weder nach der 1. Immunisierung noch nach der zweiten und dritten Immunisierung einen signifikanten Unterschied zwischen WT und DERE Mäusen in Bezug auf den Anti-*tAChR* Antikörpertiter. Beim Vergleich der beiden Mauslinien hinsichtlich ihrer mAChR-spezifischen Antikörperlevel lässt sich nach der dritten Immunisierung bei geringer Tierzahl ebenfalls kein Unterschied feststellen. Somit scheint die Depletion der Treg-Zellen wenigstens in der frühen Phase der EAMG Entwicklung, keinen Einfluß auf die Antikörperproduktion zu haben.

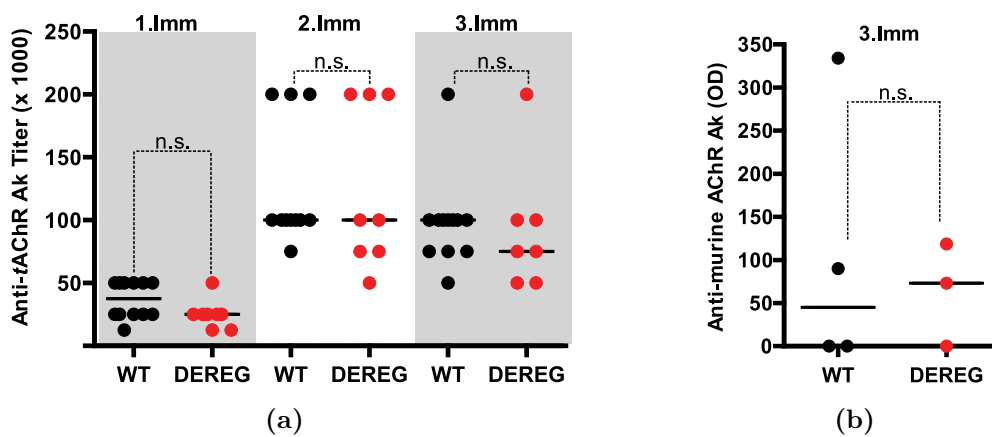


Abbildung 3.25: (a) Anti-*t*AChR-Antikörpertiter und (b) Anti-mAChR Antikörperlevel von *t*AChR-immunisierten WT und DERE Mäusen. Von den Mäusen wurde jeweils 3 Wochen nach den Immunisierungen *s.m.* Blut abgenommen, das hinsichtlich spezifischer Antikörper analysiert wurde. In Abb.(a) ist der Anti-*t*AChR-Antikörpertiter nach wiederholten Immunisierungen für die WT (N=12) und DERE Mäuse (N=8) dargestellt. Rechts (b) ist der Anti-mAChR Antikörperlevel nach der dritten Immunisierung gezeigt (N=4 für WT Mäuse und N=3 für DERE Mäuse). Die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten wurden hier gepoolt.

4 Diskussion

4.1 Relevanz der TH17-Zellen für die EAMG

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals die essentielle Rolle der TH17-Zellen für die Pathogenese der EAMG demonstriert werden. TH17-Zellen werden wie bereits beschrieben mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht [68]. Im Hinblick auf die EAMG, dem Tiermodell, das zur Untersuchung der Autoantikörper-vermittelten Autoimmunerkrankung Myasthenia Gravis herangezogen wird, wurden bisher nur indirekte Hinweise auf eine Beteiligung der TH17-Zellen für das Krankheitsgeschehen gefunden. Diese stützen sich größtenteils auf experimentelle EAMG Daten die TH17-Zelldifferenzierung betreffend [92–95].

4.1.1 Vergleich der EAMG in IL17^{ko} und WT Mäusen

Zur weiteren Analyse der Rolle von IL17 bezüglich sowohl der T-Zell Differenzierung als auch der EAMG Pathogenese wurden IL17^{ko} Mäuse mit dem *tAChR* immunisiert und deren Krankheitsparameter mit denen von WT Mäusen verglichen. Ähnlich zu vorherigen Untersuchungen [97], kam es in den IL17^{ko} Mäusen im Vergleich zu den WT Tieren zu einer annähernd aufgehobenen EAMG Induktion, gekennzeichnet durch eine geringe Inzidenz und EAMG Stärke. Insofern bestätigt sich, dass IL17A in noch unklarer Weise in autoimmune Prozesse involviert ist, während die Expression von IL17F allein nicht ausreicht für die Induktion des autoimmunen Phänotyps - hier der EAMG. Denn der Knock-out bezog sich hier allein auf das Effektorzytokin IL17A, obwohl TH17-Zellen auch ein weiteres pro-inflammatorisches Zytokin der IL17 Familie sekretieren - das Zytokin IL17F. IL17F wurde hier nicht genauer betrachtet, allerdings weisen verschiedene Studien auf eine unbedeutendere Rolle bei Autoimmunerkrankungen hin [126, 127], die sich durch eine begrenzte Verteilung des IL17RC Rezeptors auf Immunzellen [128] sowie einer schwächeren pro-inflammatorischen Zytokin-Induktion erklären lässt [101, 127]. IL17A und F teilen sich die Rezeptoren IL17RC und IL17RA. Jedoch bindet IL17F den

Rezeptor IL17RA, der vor allem auf hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, mit deutlich geringerer Affinität als IL17A. Während beide Zytokine den Rezeptor IL17RC mit vergleichbarer Affinität binden [128]. Die über IL17F-vermittelte Signaltransduktion läuft somit wohl hauptsächlich über IL17RC, der überwiegend auf nicht-hämatopoetischen Zellen nachgewiesen wurde.

Als Bestätigung früher Myasthenie Studien, die nach polyklonaler Restimulation IL17-exprimierende TH-Zellen innerhalb der Milzzellen [95, 97] oder PBMCs [99] detektieren konnten, wurden im Rahmen dieser Arbeit Milzzellen sowohl polyklonal als auch spezifisch *ex vivo* stimuliert. IL17-produzierender CD4⁺ T-Zellen ließen sich in *tAChR*-immunisierten WT Mäusen sowohl polyklonal nach PMA/Ionomycin Stimulation als auch spezifisch nach Stimulation mit dem immundominanten *tAChR*-Peptidpool P2 nachweisen. Mit welcher Kinetik *tAChR*-spezifische TH17-Zellen in WT Mäusen nach EAMG Induktion generiert werden, wurde ebenfalls untersucht. Dafür wurden murine PBMCs jeweils zwei Wochen nach der Immunisierung stimuliert und durchflußzytometrisch analysiert. Innerhalb der murinen PBMCs ließen sich IL17-produzierende *tAChR*-spezifische TH-Zellen bereits nach 14 Tagen messen, allerdings kam es im Verlauf der EAMG zu keinem signifikanten Anstieg dieser Zellen. Diese Beobachtung könnte sowohl auf eine Rolle der TH17-Zellen in der frühen Phase der EAMG Entwicklung sowie auf eine konstante krankheitserhaltende Funktion über die Zeit hindeuten. Für eine Relevanz in der frühen Phase spricht, dass insbesondere die TH17-Zelldifferenzierung durch die *tAChR*-CFA Immunisierung in der initialen Phase der EAMG getriggert wird. Denn die bakteriellen Bestandteile des CFAs führen zu einer Produktion des Zytokins IL6 durch Zellen des angeborenen Immunsystems [129] und wie bereits beschrieben benötigen die TH17-Zellen IL6 aber auch TGF β für ihre Entwicklung [130]. In dieser Hinsicht könnten sich EAMG und MG Entwicklung ähneln, denn obwohl die Ätiologie der MG bisher noch unbekannt ist, spricht vieles für eine Beteiligung des Thymus [8]. Dabei ist im Zusammenhang mit der Differenzierung von TH17-Zellen interessant, dass auch TECs in der Lage sind IL6 zu produzieren [131, 132] und, dass MG Patienten mit einer Thymus-Hyperplasie eine erhöhte IL6 Produktion ihrer TECs aufweisen [133].

Im Folgenden sollte außerdem untersucht werden, wie sich der IL17 Knock-out auf das T-Zell Priming in der EAMG auswirkt. Zu den in diesem Zusammenhang analysierten Zytokinen zählten IFN γ , IL2 sowie IL21. Weshalb gerade diese Zytokine? IFN γ hat sowohl eine hemmende Wirkung bezüglich der TH17-Zell Differenzierung [38, 60], kann allerdings unter bestimmten Bedingungen auch von TH17-Zellen produziert werden [134]. IL2 wirkt

STAT5 assoziiert begrenzend auf die IL17 Produktion [81] und IL21 ist involviert in die B-Zell Entwicklung und den Ig Klassenwechsel [63], das bezogen auf den B-Zell abhängigen Charakter der Myasthenie ebenfalls von besonderem Interesse war. Allerdings konnte kein signifikanter Unterschied in der Frequenz Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen als auch in der Produktion ihrer Zytokine im EAMG Modell festgestellt werden. Für IL17A-defiziente Mäuse wurde von Nakae *et al.* gezeigt, dass polyklonale Stimuli weder die T-Zellproliferation noch deren IL4 oder IFN γ Produktion beeinflussen [115]. Jedoch führt der Knock-out in verschiedenen allergischen Erkrankungen wie CHS, DTH und AHR zu einer reduzierten Allergen-spezifischen T-Zellaktivierung und im Fall von CHS und DTH konnten verringerte IFN γ -Level nachgewiesen werden [115]. Ähnliche Resultate wurden auch bei der Kollagen-induzierten Arthritis gefunden. Hier kam es zu einer Suppression der Erkrankung im IL17^{ko}. Weiterhin wird in der Studie eine Beteiligung des Zytokins IL17 am Autoantigen-spezifischen T-Zellpriming vermutet [135, 136]. Obwohl auch im EAE Modell das Fehlen von IL17 zu einer Unterdrückung der Autoimmunerkrankung führt, wurden anders als bei CHS und DTH für IFN γ -produzierende CD4⁺ T-Zellen prozentual erhöhte Werte in IL17A^{-/-} Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen gemessen [127, 137]. Während IL17 für entzündliche Darmerkrankungen, wie der DSS-induzierten Colitis, eine protektive Rolle zu spielen scheint, denn IL17A-defiziente Mäuse entwickeln stärkere Symptome als der WT [127]. Der IL17^{ko} scheint sich im EAMG Modell, im Gegensatz zu den beschriebenen Modellen, nicht auf die tAChR-spezifische T-Zellaktivierung oder auf die Expression der betrachteten Zytokine auszuwirken, jedoch auf die Krankheitsentwicklung.

Der beobachtete Phänotyp lässt sich auch nicht anhand von Effekten der IL17-Defizienz auf die Frequenz der nTregs sowie der iTregs erklären. Da die entsprechende Fraktion HELIOS⁺ Zellen, die als aus dem Thymus-stammende Tregs definiert werden [125], in dem Versuchsansatz keine Veränderung aufwies. Diese Ergebnisse sprechen gegen einen Einfluß von IL17 auf dendritische Zellen und folglich auch auf das T-Zell Priming [138, 139] im EAMG Modell. Jedoch ist die Verwendung des Markers HELIOS zur Klassifikation der Treg-Zellen in nTregs und iTregs unter Vorbehalt zu betrachten. Da die Expression des Markers mit der T-Zellaktivierung und Zellteilung assoziiert ist, wurde dessen Eignung zur Klassifizierung bereits angezweifelt [140]. Allerdings konnten von Himmel *et al.* erst kürzlich sowohl HELIOS⁺ als auch HELIOS⁻ nTregs in huPBMCs nachgewiesen werden [141].

Weiterhin konnten bezüglich der Frequenz der Treg-Zellen, definiert durch die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3, keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zwi-

schen WT und IL17^{ko} Mäusen beobachtet werden, trotz der reziproken Differenzierung der TH17- und iTreg-Zellen [76, 82, 83, 142]. Allerdings ist generell im EAMG Modell unklar, ob sich die Autoimmunität auf eine Reduktion der Treg-Zellen oder nicht viel eher auf einen Funktionsverlust ihrer Suppressor-Aktivität zurückführen lässt [90, 91].

Jedoch schließen diese Resultate nicht die Möglichkeit aus, dass der beobachtete EAMG-resistente Phänotyp seinen Ursprung in der IL17-Defizienz anderer Zelltypen hat. Sowohl CD8⁺ T-Zellen [102], NK/NKT-Zellen [103, 104], γ/δ T-Zellen [105] und B-Zellen [106] sind in der Lage das Zytokin IL17 zu produzieren und zumindest für NK- und B-Zellen ist eine direkte Beteiligung in die Myasthenie Entwicklung belegt [109, 112]. Während es ohne B-Zellen nicht zu einer Krankheitsentstehung kommt, da es sich um eine Autoantikörper-basierte Erkrankung handelt [112], führt die Depletion von NK-Zellen zu einer Reduzierung der EAMG Symptome [109]. Hinsichtlich der CD8⁺ T-Zellen gibt es widersprüchliche Beobachtungen [107, 108], einige deuten wie auch für die NK T-Zellen [111] eine regulatorische Funktion in der Krankheitsentstehung an. Diese These wird durch die Studie von Shenoy *et al.* gestützt, in der ausgeprägtere EAMG Symptome in MHC I / CD8 defizienten Tieren nachgewiesen werden konnten [107]. Im Gegensatz dazu lassen die Arbeiten von Zhang *et al.* eher eine pathogene Funktion der CD8 T-Zellen vermuten, denn die Antikörper-vermittelte Depletion dieser Zellen führte hier zu einer Verringerung der EAMG Symptome [108]. Während die Depletion der NKT-Zellen die EAMG Entwicklung nicht beeinflusst [109], scheint die Aktivierung der NKT-Zellen mit α -GalCer den EAMG Phänotyp zu inhibieren durch eine gleichzeitig Zunahme der Treg-Population. Ein Effekt, der wohl auf das von NKT-Zellen α -GalCer-abhängig produzierte IL2 zurückzuführen ist [111]. Somit lässt sich über die NKT-Zellaktivierung Einfluß auf die Treg-vermittelte Immunregulation nehmen. Zur Rolle von γ/δ T-Zellen in der MG oder EAMG ist bisher nichts bekannt.

4.1.2 Vergleich der EAMG in CD4⁺ T-Zell-rekonstituierten, TCR β/δ ^{ko} Mäusen

Welche Relevanz haben also TH17-Zellen in diesem Kontext? Zur Klärung dieser Frage, wurden im Rahmen dieser Arbeit CD4⁺ T-Zellen von entweder IL17^{ko} oder WT Mäusen in T-Zell defiziente TCR β/δ ^{ko} Mäuse transferiert. TCR β/δ ^{ko} Mäuse besitzen sowohl NK- als auch B-Zellen, jedoch weder CD8⁺-, NK- und γ/δ T-Zellen. Durch den adoptiven Transfer der CD4⁺ T-Zellen, waren in den mit WT CD4⁺ T-Zellen rekonstituierten TCR β/δ ^{ko} Mäusen nur TH17-, B- oder NK-Zellen in der Lage IL17 zu exprimieren. Während in den

TCR β/δ^{ko} Mäusen mit IL17-defizienten CD4 $^{+}$ T-Zellen nur B- und NK-Zellen eine Quelle für das Zytokin IL17 darstellten. Inwiefern das für die EAMG Induktion ausreichte, blieb zu untersuchen.

Eine EAMG Entwicklung in mit IL17 $^{\text{ko}}$ CD4 $^{+}$ T-Zellen rekonstituierten TCR β/δ^{ko} Mäusen würde folglich für eine gewichtigere Rolle des von NK-und/oder B-Zellen produzierte IL17 sprechen. Während ein Ausbleiben der EAMG Induktion in diesem Fall einen direkten Hinweis auf die TH17-Zellen liefert. Eine gleichzeitige Induktion in WT CD4 $^{+}$ T-Zellen rekonstituierten TCR β/δ^{ko} Mäusen würde für eine essentielle Rolle der TH17-Zellen für die Pathogenese der MG sprechen.

In der Tat, ließen sich die vorherigen Ergebnisse einer nahezu aufgehobenen EAMG Induktion in IL17 $^{\text{ko}}$ Mäuse auch in mit IL17 $^{\text{ko}}$ CD4 $^{+}$ T-Zellen rekonstituierten Mäusen bestätigen. Außerdem war die EAMG Induktion in mit WT CD4 $^{+}$ T-Zellen rekonstituierten Mäusen möglich und interessanterweise vergleichbar mit der in WT Tieren. Somit konnte in der vorliegenden Arbeit bewiesen werden, dass selbst eine auf CD4 $^{+}$ T-Zellen beschränkte IL17 Defizienz für die Entstehung eines weithin EAMG-resistenten Phänotyps ausreicht.

Obwohl funktionelle NK-Zellen in dem Ansatz mit den CD4 $^{+}$ T-Zell rekonstituierten TCR β/δ^{ko} Mäusen vorhanden waren und Shi *et al.* eine Beteiligung an der Krankheitsentwicklung beschreibt [109], sind diese zumindest für die EAMG Induktion in den mit IL17 $^{\text{ko}}$ CD4 $^{+}$ T-Zellen rekonstituierten Mäusen bzw. hinsichtlich des produzierten IL17 von untergeordneter Bedeutung. Allerdings gibt es auch Studien, die NK-Zellen eine inhibitorische Funktion bezüglich der TH17-Zellen zuordnen [143, 144]. Diese Studien lassen sich jedoch weder mit den hier diskutierten noch mit den von Shi *et al.* publizierten Beobachtungen vereinbaren. Ähnliches gilt für die Arbeit von Liu *et al.*, die für das von autoreaktiven CD4 $^{+}$ T-Zellen produzierte IL21, das neben IL17 ebenfalls von TH17-Zellen sekretiert werden kann, eine degenerative Wirkung auf NK-Zellen im EAMG Model postuliert [110].

Zur Untersuchung wie IL17-produzierende CD4 $^{+}$ T-Zellen die Krankheitsentwicklung vermitteln, wurden anti-AChR Antikörperlevel in WT und IL17 $^{\text{ko}}$ Mäusen sowie in TCR β/δ^{ko} Mäusen - transferiert mit entweder WT oder IL17 $^{\text{ko}}$ CD4 $^{+}$ T-Zellen - analysiert. Im Gegensatz zu Bai *et al.* [97] konnte bezogen auf den Anti-*t*AchR Antikörpertiter kein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Mäusen nach der dritten Immunisierung nachgewiesen werden. Bei der Messung der Anti-murinen AChR Antikörper, die effektiv an den AChR der neuromuskulären Synapse binden, konnten jedoch signifikant

geringere Autoantikörperlevel in Mäusen, mit einem IL17^{ko} oder mit einer auf CD4⁺ T-Zellen beschränkte IL17-Defizienz, detektiert werden. Demzufolge scheint das Fehlen von IL17-produzierenden CD4⁺ T-Zellen die Selbst-Toleranz der B-Zellen gegen den murinen AChR im EAMG Modell zu bewahren sowie eine ausgeprägte Krankheitsentwicklung zu verhindern. Im Vergleich dazu bleibt die humorale Immunität gegen das für die Immunisierung und damit für die EAMG Induktion verwendete Antigen *t*AChR größtenteils unbeeinflusst. Allerdings sagt der Antikörpertiter nicht unbedingt etwas über die Ausprägung der Myasthenie aus, denn selbst MG Patienten mit einem vergleichsweise geringem Anti-hAChR Titer, können unter stärkeren klinischen Symptomen leiden als Patienten mit einem höheren Anti-hAChR Titer [27]. Eine Korrelation zwischen dem Antikörpertiter und der MG Stärke wurde bei MG Patienten nur intraindividuell [17] oder bei Betrachtung MIR-bindender Anti-hAChR Antikörper festgestellt [28]. Auch im EAMG Modell ist eine Korrelation der beiden Parameter schwierig [145]. Dass der Antikörpertiter nicht mit der Stärke der Erkrankung korreliert, kann einerseits an unterschiedlichen Epitop Spezifitäten, andererseits an verschiedenen Antikörper Isotypen liegen, in Abhängigkeit ihrer Bedeutung für den Komplement-vermittelten AChR Abbau. In IL17-defizienten Mäusen wurden hinsichtlich der humoralen Immunantwort verschiedene Beobachtungen gemacht, so führte der Knock-out ähnlich wie im EAMG Modell zu einer supprimierten Antikörper Produktion bei Kollagen-induzierter Arthritis, CHS und DTH [115, 135]. Im EAE Modell jedoch fanden Komiyama *et al.* erhöhte Anti-MOG-spezifische Antikörperlevel [137].

Interessanterweise gibt es keine signifikante CD4⁺ T-Zell Autoimmunantwort gegen die α -Untereinheit des murinen AChRs im EAMG Modell [3, 122], jedoch eine signifikante Fraktion von *t*AChR-spezifischen CD4⁺ T-Zellen. Im Gegensatz zur beobachteten Antikörperentwicklung, scheint die T-Zell Toleranz gegenüber dem mAChR sogar während späterer Stadien der Erkrankung erhalten zu bleiben.

Die hier dargelegte essentielle Rolle von IL17 für die EAMG Pathogenese basiert möglicherweise auf ihren Effekt hinsichtlich der B-Zell Keimzentren Entwicklung, denn in autoimmunen BXD2 Mäusen konnte gezeigt werden, dass IL17 die spontane Entwicklung von Keimzentren fördert [114]. Hsu *et al.* konnten in Milzen von BXD2 Mäusen sowohl eine erhöhte Frequenz IL17-produzierender CD4⁺ T-Zellen sowie eine verstärkte Expression des IL17-Rezeptors auf B-Zellen im Vergleich zu WT Mäusen nachweisen. Außerdem ließ sich in einer Studie von Mitsdoerffer *et al.* [146] die Keimzentren Formation durch adoptiven Transfer von TH17-Zellen in WT-Empfänger Mäuse insbesondere in den Lymphknoten und der Milz induzieren. Während Mäuse mit einer IL6-Defizienz,

einem für die TH17-Zell Differenzierung wichtigen Zytokin, eine Reduktion ihrer Keimzentren aufwiesen [92]. Die B-Zell Keimzentren unterteilen sich in eine helle, vor allem aus Zentrozyten, T-Zellen und follikulären DCs bestehende, und eine dunkle, aus Zentroblasten bestehende, Zone. Die B-Zellen der dunklen Zone zeichnen sich durch eine hohe Expression von CXCR4, dem Rezeptor für CXCL12 und die B-Zellen der hellen Zone wiederum exprimieren verstärkt CXCR5, dem Rezeptor für CXCL13 [147]. Follikuläre DCs scheinen eine Quelle für das Chemokin CXCL13 zu sein [148]. Sowohl Follikuläre DCs als auch TFH-Zellen sind wichtig für die Keimzentren Entwicklung und Funktion - TFH-Zellen sogar essentiell [148]. In der dunklen Zone findet vor allem die somatische Hypermutationen und Proliferation der B-Zellen statt. Zu den Funktionen der hellen Zone zählen die Selektion der B-Zellen, die hoch-affine Antikörper sezernieren und die Differenzierung der B-Zellen in B-Gedächtniszellen und langlebige Plasmazellen [149]. Bis Antikörper-sezernierende Plasmazellen oder B-Gedächtniszellen die Keimzentren verlassen durchlaufen sie einige Mutations- und Selektionsrunden. Deshalb ist eine Wanderung der B-Zellen zwischen den beiden Zonen von besonderer Bedeutung [38, 147]. Das Zytokin IL17 führt zu einer verminderten B-Zell Migration innerhalb der Keimzentren und zu einer Erhöhung des Kontakts zwischen TFH- und B-Zellen, die zur Folge haben, dass mehr auto-reaktive Plasmazellen aus den Keimzentren emmigrieren [147], die eine Gefahr für die Erhaltung der Selbst-Toleranz darstellen. Die Modulierung der B-Zell Mobilität durch IL17 wird, wie Xie *et al.* zeigen konnte, über den kanonischen NF- κ B Signalweg induziert [150]. Dabei vermittelt IL17 die Hochregulierung von RGS13 und RGS16, die zu einer reduzierten Chemokine CXCL12- und CXCL13-abhängigen Chemotaxis der B-Zellen führt [114, 150]. Eine ähnliche ektopische Keimzentren-Bildung konnte ebenfalls bei EOMG Patienten - hier allerdings im Thymus - beobachtet werden [42].

Als weiteren Erklärungsansatz für den EAMG-resistenten Phänotyp kommt allerdings auch ein Einfluß des Zytokins IL17 und der TH17-Zellen auf den Isotop-Wechsel in Frage, denn sowohl TH17-Zellen als auch IL17 alleine sind in der Lage den IgG Klassenwechsel in eine bestimmte Richtung zu leiten. Für den Komplement-bedingten Verlust des AChRs im murinen EAMG Model sind die Isotypen IgG2a und IgG2b von besonderer Bedeutung [51]. Von Mitsdoerffer *et al.* [146] konnte die Induktion des Klassenwechsel in Richtung IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3 durch TH17-Zellen ebenso gezeigt werden wie der Klassenwechsel zu IgG2a und IgG3 durch das Zytokin IL17. Weiterhin wurden in IL6^{-/-} Mäusen reduzierte IgG Level gefunden [92]. Die TH17-Zellen bzw. das von ihnen produzierte Zytokin IL17 scheinen somit vor allem aufgrund der Wirkung auf B-Zellen in die EAMG

Pathogenese involviert zu sein.

Da sowohl TH17-Zellen als auch IL17A mit der Entwicklung verschiedener Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht werden [68], gibt es aktuell eine Reihe klinischer Studien, die einerseits die TH17-Entwicklung mittels Anti-IL6R (Tocilizumab) oder Anti-p40UE Antikörper (Ustekinumab) zu inhibieren versuchen als auch Ansätze das Zytokin IL17A direkt durch Anti-IL17A Antikörper (Ixekizumab) zu neutralisieren. Der Antikörper gegen das humane IL17A zeigt sowohl bei Psoriasis Patienten [151] als auch bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis [152] vielversprechende Ergebnisse und befindet sich in der Zulassungsphase. Während sowohl der Anti-IL6R Antikörper [153] als auch der Anti-p40UE Antikörper [154] bereits zugelassen und erfolgreich für bestimmte Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden. Inwiefern diese Medikamente zu einer Verbesserung der MG Symptome führen, bleibt zu klären. Für einen möglichen Einsatz dieser Mittel sprechen allerdings folgende Umstände, sowohl TH17-Zellen als auch IL17A spielen eine wichtige Rolle für die EAMG, außerdem führt die Blockierung der TH17-Zelldifferenzierung durch Anti-IL6 Antikörper zu einer Unterdrückung der EAMG [93]. Jedoch lassen sich Beobachtungen aus tierexperimentellen Ansätzen nicht immer auf den Menschen übertragen, wie auch am Beispiel der Anti-p40UE Antikörper bezogen auf die Multiple Sklerose festzumachen ist [155, 156].

Eine möglicherweise kontroverse Beobachtung im Zusammenhang mit TH17-Zellen und IL17 konnte Liu *et al.* [157] machen, so führt eine T-bet Defizienz zu verringerten EAMG Symptomen bei einer gleichzeitigen Zunahme der IL17-produzierenden CD4⁺ T-Zellen. Weiterhin führt das Fehlen von T-bet zu einer Abnahme der IFN γ -produzierenden CD4⁺ T-Zellen, zu einer Reduktion der Level verschiedener IgG Isotypen allerdings auch zu einer Zunahme der Treg-Zellpopulation [157]. Sind TH17-Zellen also doch nicht so relevant für die Krankheitsentwicklung? In erster Linie ist T-bet als Transkriptionsfaktor für die Entwicklung der TH1-Zellen und der TH1-Zell spezifischer IFN γ Expression von Bedeutung, jedoch betrifft T-bet auch noch viele andere Immunzellen [158] u.a. den Klassenwechsel in B-Zellen [159]. Aufgrund dessen könnte hier die Zunahme der IL17-produzierenden CD4⁺ T-Zellen ohne größere Bedeutung sein. Diese Hypothese wird auch durch die experimentellen Daten von Duhon *et al.* [160] gestützt, die eine EAE Entwicklung in CD4⁺ T-Zell T-bet depletierten Tieren zeigen konnten, im Gegensatz zu einem EAE-resistenten Phänotyp in T-bet^{-/-} Mäusen [161].

Es konnte in dieser Arbeit die essentielle Rolle der IL17-produzierenden CD4⁺ T-Zellen demonstriert werden. Während, wie bereits beschrieben, die T-Zell Toleranz sogar in WT

Mäusen bestehen bleibt [3, 122], hängt die B-Zell Autoimmunität möglicherweise deren Antikörper Produktion gegen den murinen AChR sowie die Krankheitssymptome scheinbar von IL17-exprimierenden $CD4^+$ T-Zellen ab. Demzufolge konnte hier in einer klassischen Antikörper-vermittelten Autoimmunerkrankung, die das EAMG Modell darstellt, die bedeutende Rolle der TH17-Zellen veranschaulicht werden. Diese Beobachtungen werfen ein neues Licht auf die Pathogenese Autoantikörper-vermittelter Erkrankungen im allgemeinen und implizieren ein therapeutisches Potential für die aktuell entwickelten Medikamente gegen das Zytokin IL17 in der B-Zell-vermittelten Autoimmunität.

4.2 Die Rolle von regulatorischen T-Zellen für die EAMG

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Depletion von Treg-Zellen in der frühen Phase der EAMG weder einen Einfluß auf die EAMG Pathogenese noch auf das Priming der untersuchten TH-Subpopulationen hat.

Verschiedene Studien beschäftigen sich mit quantitativen und qualitativen Defekten der Treg-Zellen im Zusammenhang mit der MG [84–89] als auch der EAMG [90, 91]. Wie sich eine Depletion regulatorischer T-Zellen auswirkt, wurde allerdings bisher noch nicht untersucht. Von Nessi *et al.* [90], gestützt von Beobachtungen von Aricha *et al.* [91], wurde gezeigt, dass sich eine präventive Gabe von Tregs positiv auf die EAMG auswirkte, während eine spätere therapeutische Gabe ohne Einfluß auf die Krankheitsentwicklung blieb. Spielt, die von Treg-Zellen vermittelte, Toleranzerhaltung vor allem eine Rolle für die initiale Phase der EAMG Entwicklung? Zur Klärung dieser Fragestellung wurden in der vorliegenden Arbeit Treg-Zellen vor der ersten Immunisierung mithilfe von DEREГ Mäusen depletiert.

Jeweils an zwei aufeinanderfolgenden Tagen wurden die Treg-Zellen durch die Gabe von DT spezifisch depletiert. Jedoch zeigt der Vergleich der EAMG Stärke als auch der Inzidenz keinen signifikanten Unterschied zwischen WT und Treg-Zell depletierten DEREГ Mäusen. Insofern scheint sich eine Depletion in der frühen Phase der EAMG nicht auf die Krankheitsentwicklung an sich auszuwirken. Eine Beobachtung, die sich auch auf Antikörper-Ebene widerspiegelt. Denn sowohl hinsichtlich *t*AChR-spezifischer Antikörper als auch bei Anti-murinen AChR Antikörpern konnte kein signifikanter Unterschied aufgrund der fehlenden Tregs festgestellt werden. Ein Erklärungsansatz bezieht sich auf das DEREГ-Modell an sich, denn wie unter 2.3.1 beschrieben, ist die Depletion zeitlich begrenzt und abhängig von der verwendeten Mauslinie unterschiedlich effizient [117–119].

Die, in dieser Arbeit, eingesetzten Tiere besaßen eine Depletioseffizienz zwischen 95-98% [117, 119]. Somit besteht die Möglichkeit, dass die verbliebenen Treg-Zellen ausreichen, um die EAMG Entwicklung auf einem normalen Niveau zu halten. In den Publikationen von Nessi *et al.* [90] und Aricha *et al.* [91] erfolgt die Gabe *ex vivo* generierter Tregs sieben bzw. vier Tage nach der Immunisierung, während in dem hier dargestellten Fall die Depletion vor der Immunisierung stattfand. Die Transgen-negativen Foxp3⁺ Treg-Zellen wachsen nach der Depletion der Transgen-positiven Foxp3⁺ Treg-Zellen innerhalb von zwei Wochen wieder hoch, so dass der Treg-Pool wieder aufgefüllt ist. Bereits nach fünf Tagen sind wieder Tregs nachweisbar, also schon in einer Phase, in der die Treg-Zellen, die beginnende primäre Immunantwort beeinflussen können. Eine Depletion zu einem späteren Zeitpunkt, kurz nach der ersten Immunisierung, wäre möglicherweise effektiver gewesen.

Die Beobachtungen von Nessi *et al.* [90] wie auch von Aricha *et al.* [91] hinsichtlich der Bedeutung der Treg-Zellen in der Anfangsphase, beziehen sich auf eine zusätzliche Gabe differenzierter Tregs mit normaler Suppressorfunktion. Das die Depletion der Treg-Zellen anscheinend keine Relevanz hat zu dem gewählten Zeitpunkt, lässt sich möglicherweise durch die Immunisierung selbst erklären. Die Mechanismen, die der EAMG Induktion zugrundeliegen, befördern die TH17-Differenzierung durch die Ausschüttung von IL6 und inhibieren dadurch wohl gleichzeitig die Differenzierung der iTreg-Zellen [65]. Die iTregs entwickeln sich in der Peripherie und entspringen einem eng an die TH17-Differenzierung gekoppelten Differenzierungsweg [76, 82, 83, 142]. Daraus abgeleitet, fehlen sowohl in den *tAChR*-immunisierten WT Mäusen als auch in den Treg-Zell depletierten DEREK Mäusen funktionale iTreg-Zellen. Damit ließe sich der hier beobachtete, simultane EAMG Krankheitsverlauf in WT und DEREK Mäusen nach Immunisierung mit dem *tAChR* möglicherweise erklären.

Wie bereits beschrieben, wirkte sich ein IL17^{ko} in *tAChR*-immunisierten Mäusen nicht auf die Frequenz der Treg-Population aus, jedoch positiv auf die EAMG Krankheitsentstehung. Inwiefern das Fehlen von regulatorischen T-Zellen die TH17-Zellen und das T-Zellpriming beeinflusst sollte ebenfalls untersucht werden. Während für Treg-Zellen eine wichtige Funktion für die Inhibition autoreaktiver Prozesse beschrieben wird [59], spielen TH17-Zellen und das von ihnen produzierte Effektorzytokin IL17 wie bereits dargelegt eine krankheitsfördernde Funktion bei der Entstehung der EAMG. Zudem sind die Tregs wie unter 1.4.2 beschrieben in der Lage die TH17-Zellen direkt als auch indirekt zu inhibieren.

Im Folgenden wurde die Frequenz *tAChR*-spezifischer CD4⁺ T-Zellen und deren IL17,

IFN γ und IL21 Produktion in WT und DEREK Mäusen analysiert. Jedoch konnten weder für die Frequenz CD40L⁺ CD4⁺ T-Zellen noch für deren Zytokin-Produktion Unterschiede zwischen den untersuchten Mäusen beobachtet werden. Allenfalls für die Antigen-spezifische IFN γ und IL17 Sekretion der CD4⁺ T-Zellen fand sich eine tendenziell höhere Expression in den DEREK Mäusen, die aber nicht signifikant war. In einer Studie von Chen *et al.* [83] wurde unabhängig von einem Krankheitsmodell die Auswirkung einer Depletion von regulatorischen T-Zellen auf das TH17-Zell Priming untersucht. Die Beobachtungen dieser Studie, dass Treg-Zellen die TH17-Zell Differenzierung befördern statt sie zu inhibieren und dem Zytokin IL2 dabei eine bedeutendere Rolle zukommt, lässt sich im EAMG Modell nicht bestätigen. Da kein signifikanter Unterschied der IL17-exprimierenden TH-Zellen festgestellt werden konnte. Allerdings darf dabei auch nicht außer Acht gelassen werden, dass in dieser Arbeit sowohl eine andere Mauslinie für die Treg-Zell Depletion verwendet wurde [117] sowie die Analyse der *t*AchR-spezifischer Zytokin-produzierenden CD4⁺ T-Zellen zu einem späteren Zeitpunkt vorgenommen wurde.

Bezüglich der Homeostase von Immunzellen nach Treg-Zell Depletion wurde von Milanez-Almeida *et al.* kürzlich die Beobachtung gemacht, dass es vor allem in den Lymphknoten zu einem Anstieg von DCs, NK-Zellen, Monozyten, Neutrophile Granulozyten als auch B-Zellen kommt und weniger in der Milz [162]. Die Untersuchungen erfolgten allerdings jeweils kurz nach Depletion der Treg-Zellen in den DEREK Mäusen anders als in dem hier diskutierten Fall. In einem *M.bovis* BCG-Infektionsmodell wurden IL17 und IFN γ -produzierende TH-Zellen 20 Tage post-Infektion in der Milz untersucht. Weder für IL17- noch für IFN γ -sekretierende CD4⁺ T-Zellen konnte ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden, allenfalls ähnlich im EAMG Modell eine tendenziell höhere Expression in den Treg-Zell depletierten DEREK Mäusen [163]. Eine erhöhte Zytokinproduktion, nach OVA-Stimulation von mediastinalen Lymphknotenzellen, der Zytokine Il4, IL5 und IL13 nicht aber des Zytokins IFN γ konnte in Treg-Zell depletierten DEREK Mäusen eines Mausmodells allergisch bedingter Lungenentzündung detektiert werden [164]. Eine Untersuchung der *t*AchR-spezifischer CD4⁺ T-Zellen in den Lymphknoten wäre bezüglich der DEREK Mäuse im Nachhinein noch interessant gewesen, obwohl die Publikation von Baru *et al.* zumindest für IFN γ nicht für einen signifikanten Unterschied zwischen WT und Treg-Zell depletierten DEREK Mäusen in Lymphknoten spricht, wenn man die unterschiedlichen Modelle unberücksichtigt lässt.

Für die Pathogenese der EAMG spielte zumindest die temporäre Treg-Zell Depletion

in der Induktionsphase keine Rolle. Inwiefern eine Depletion der Treg-Zellen zu einem späteren Zeitpunkt - bspw. kurz nach der 1.Immunisierung - die Pathogenese der EAMG beeinflusst, könnte in weiterführenden Versuchen noch untersucht werden, um die Bedeutung der Treg-Zellen für die EAMG und die Phase der primären Immunantwort noch stärker zu beleuchten. Außerdem wäre es interessant den Fokus dabei mehr auf die Suppressorfunktion der Treg-Zellen zu legen.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit eine essentielle Rolle der TH17-Zellen und des von den TH17-Zellen produzierten Zytokins IL17 für die B-Zell Toleranz im EAMG Modell festgestellt werden. Da Anti-IL17A-Antikörper bereits vielversprechende Resultate bei anderen Autoimmunerkrankungen zeigten und das von TH17-Zellen produzierte IL17 auch im EAMG Modell eine Rolle spielt, würde sich ein Einsatz möglicherweise auch hier lohnen. Deshalb wäre es interessant zu untersuchen, ob sich die Entwicklung der EAMG in WT Mäusen durch eine präventive oder therapeutische Gabe von anti-IL17A Antikörpern beeinflussen ließe. Eine Unterdrückung der EAMG durch Anti-IL17A-Antikörper könnte auch für MG Patienten eine neue therapeutische Option bieten.

5 Zusammenfassung

Die Myasthenia Gravis (MG) ist ein Prototyp einer Antikörper-vermittelte Autoimmunerkrankung. Obwohl die MG zu den selteneren Erkrankungen zählt, ist sie durch die sehr gute Charakterisierung ihres Autoantigens - dem nikotinischen Acetylcholinrezeptor (nAChR) - von besonderem Interesse. Die Autoantikörper richten sich gegen den nAChR an der neuromuskulären Synapse und führen dadurch zu einer Störung der Signaltransduktion zwischen Nerv und Muskel und schließlich zu einer belastungsabhängigen Muskelschwäche. Welche Bedeutung TH17-Zellen, die mit chronisch entzündlichen Prozessen und Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht werden, für die Pathogenese der MG haben, konnte bisher noch nie direkt gezeigt werden. Mithilfe des Tiermodells "Experimentelle Autoimmune Myasthenia Gravis" (EAMG) sollte die Rolle der IL17-produzierenden CD4⁺ T-Zellen im Rahmen dieser Arbeit analysiert werden.

Eine signifikante Anzahl *t*AChR-spezifischer CD4⁺ T-Zellen, die IL17 exprimieren, konnte nach der Immunisierung mit *torpedo* AChR in CFA in Wildtyp-Mäusen (WT) beobachtet werden. Die IL17^{ko} Mäuse entwickelten interessanterweise weniger oder keine EAMG Symptome, obwohl weder die Frequenz *t*AChR-spezifischer CD4⁺ T-Zellen, die IL2, IFN γ oder IL21 sezernierten noch der prozentuale Anteil der FoxP3⁺ Treg-Zellen einen Unterschied aufwiesen. Auch die Frequenz von iTreg- und nTreg-Zellen war gleich in den untersuchten Mäusen. Im Gegensatz dazu waren die Level pathogener anti-muriner AChR Antikörper statistisch geringer in IL17^{ko} Mäusen, während bei anti-*t*AChR Antikörpertitern kein Unterschied festzustellen war. Ähnliche Resultate erbrachten TCR β / δ ^{ko} Mäuse rekonstituiert mit entweder WT oder IL17^{ko} CD4⁺ T-Zellen.

Aufgrund der bekannten Rolle von Treg-Zellen bei Autoimmunerkrankungen und angesichts des Einflusses von Treg-Zellen auf die TH17-Zellentwicklung sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob eine Depletion von Treg-Zellen in der initialen Phase der Erkrankung mithilfe von DEREK Mäusen Auswirkungen im Bezug auf die EAMG oder die TH17-Population hat. Jedoch ließen sich bezüglich der Krankheitsentwicklung, dem T-Zell Priming als auch bei der Detektion der Autoantikörper keine signifikanten Unterschiede nachweisen beim Vergleich von WT und DEREK Mäusen.

Zusammenfassend lässt sich hier festhalten, dass die Frequenz und Differenzierung Antigen-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen sowie der Antikörpertiter gegen den *tAChR* nicht durch die IL17-Defizienz im EAMG Modell beeinflusst wird. Auch hat eine frühe Treg-Zell-Depletion keinen Einfluß auf die Erkrankungsstärke. Allerdings scheint das Durchbrechen der B-Zell Toleranz, das zur Produktion von pathogenen Anti-mAChR-spezifischen Antikörpern und somit zu einer Induktion der Erkrankung führt, abhängig von IL17-produzierenden $CD4^+$ T-Zellen zu sein. Insofern könnte der Einsatz, bereits für verschiedene Autoimmunerkrankungen verwendeter Anti-IL17-Antikörper, auch für die Myasthenie eine Therapiemöglichkeit darstellen.

Literaturverzeichnis

- [1] John C Keesey. „Clinical evaluation and management of myasthenia gravis.“ In: *Muscle & nerve* 29.4 (Apr. 2004), S. 484–505. DOI: [10.1002/mus.20030](#) (siehe S. 1, 2, 4).
- [2] Sonia Berrih-Aknin. „Myasthenia Gravis: Paradox versus paradigm in autoimmunity.“ In: *Journal of autoimmunity* 52C (Aug. 2014), S. 1–28. DOI: [10.1016/j.jaut.2014.05.001](#) (siehe S. 1).
- [3] Norma Ostlie, Monica Milani, Wei Wang, David Okita und Bianca M Conti-Fine. „Absence of IL-4 facilitates the development of chronic autoimmune myasthenia gravis in C57BL/6 mice.“ In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 170.1 (Jan. 2003), S. 604–12 (siehe S. 1, 10, 48, 74, 77).
- [4] Annapurni Jayam Trouth, Alok Dabi, Noha Solieman, Mohankumar Kurukumbi und Janaki Kalyanam. „Myasthenia gravis: a review.“ In: *Autoimmune diseases* 2012 (Jan. 2012), S. 874680. DOI: [10.1155/2012/874680](#) (siehe S. 1, 8).
- [5] Trevor Hughes. „The early history of myasthenia gravis.“ In: *Neuromuscular disorders : NMD* 15.12 (Dez. 2005), S. 878–86. DOI: [10.1016/j.nmd.2005.08.007](#) (siehe S. 1).
- [6] Jolly F. „Ueber myasthenia gravis pseudoparalytica“. In: *Berlin Klin Wochenschr* 32 (1895), S. 1–7 (siehe S. 1).
- [7] Nili Avidan, Rozen Le Panse, Sonia Berrih-Aknin und Ariel Miller. „Genetic basis of myasthenia gravis - A comprehensive review.“ In: *Journal of autoimmunity* (Dez. 2013). DOI: [10.1016/j.jaut.2013.12.001](#) (siehe S. 1, 2).
- [8] Paola Cavalcante, Rozen Le Panse, Sonia Berrih-Aknin, Lorenzo Maggi, Carlo Antozzi, Fulvio Baggi, Pia Bernasconi und Renato Mantegazza. „The thymus in myasthenia gravis: Site of innate autoimmunity?“ In: *Muscle & nerve* 44.4 (Okt. 2011), S. 467–84. DOI: [10.1002/mus.22103](#) (siehe S. 2, 6, 70).
- [9] Bianca M Conti-Fine, Monica Milani und Henry J Kaminski. „Myasthenia gravis: past, present, and future.“ In: *The Journal of clinical investigation* 116.11 (Nov. 2006), S. 2843–54. DOI: [10.1172/JCI29894](#) (siehe S. 2–4, 6, 8).
- [10] A Alshekhlee, J D Miles, B Katirji, D C Preston und H J Kaminski. „Incidence and mortality rates of myasthenia gravis and myasthenic crisis in US hospitals.“ In: *Neurology* 72.18 (Mai 2009), S. 1548–54. DOI: [10.1212/WNL.0b013e3181a41211](#) (siehe S. 2).
- [11] David Grob, Norman Brunner, Tatsuji Namba und Murali Pagala. „Lifetime course of myasthenia gravis.“ In: *Muscle & nerve* 37.2 (Feb. 2008), S. 141–9. DOI: [10.1002/mus.20950](#) (siehe S. 2).

- [12] B R Thanvi und T C N Lo. „Update on myasthenia gravis.“ In: *Postgraduate medical journal* 80.950 (Dez. 2004), S. 690–700. DOI: [10.1136/pgmj.2004.018903](https://doi.org/10.1136/pgmj.2004.018903) (siehe S. 3, 11).
- [13] T M DeChiara, D C Bowen, D M Valenzuela, M V Simmons, W T Poueymirou u. a. „The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo.“ In: *Cell* 85.4 (Mai 1996), S. 501–12 (siehe S. 3).
- [14] Matthew N Meriggioli und Donald B Sanders. „Muscle autoantibodies in myasthenia gravis: beyond diagnosis?“ In: *Expert review of clinical immunology* 8.5 (Juli 2012), S. 427–38. DOI: [10.1586/eci.12.34](https://doi.org/10.1586/eci.12.34) (siehe S. 3–5).
- [15] K. Toyka, D. Brachman, A. Pestronk und I. Kao. „Myasthenia gravis: passive transfer from man to mouse.“ In: *Science* 190.4212 (Okt. 1975), S. 397–399. DOI: [10.1126/science.1179220](https://doi.org/10.1126/science.1179220) (siehe S. 4).
- [16] J Newsom-Davis, A J Pinching, Angela Vincent und S G Wilson. „Function of circulating antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis: Investigation by plasma exchange.“ In: *Neurology* 28.3 (März 1978), S. 266–266. DOI: [10.1212/WNL.28.3.266](https://doi.org/10.1212/WNL.28.3.266) (siehe S. 4).
- [17] F Schumm, A Fateh-Moghadam und J Dichgans. „[Correlation of acetylcholine receptor antibodies and clinical severity of myasthenia gravis in combined immunosuppressive therapy].“ In: *European archives of psychiatry and neurological sciences* 234.4 (Jan. 1984), S. 224–30 (siehe S. 4, 5, 74).
- [18] Avgi Mamalaki und Socrates J Tzartos. „Nicotinic acetylcholine receptor: structure, function and main immunogenic region.“ In: *Advances in neuroimmunology* 4.4 (Jan. 1994), S. 339–54 (siehe S. 4, 9, 10).
- [19] Socrates J Tzartos und Jon M Lindstrom. „Monoclonal Antibodies Used to Probe Acetylcholine Receptor Structure: Localization of the Main Immunogenic Region and Detection of Similarities between Subunits.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77.2 (Feb. 1980), S. 755–759. DOI: [10.2307/8316](https://doi.org/10.2307/8316) (siehe S. 4).
- [20] A Rødgaard, F C Nielsen, R Djurup, F Somnier und S Gammeltoft. „Acetylcholine receptor antibody in myasthenia gravis: predominance of IgG subclasses 1 and 3.“ In: *Clinical and experimental immunology* 67.1 (Jan. 1987), S. 82–8 (siehe S. 4).
- [21] W Hoch, J McConville, S Helms, J Newsom-Davis, A Melms und A Vincent. „Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies.“ In: *Nature medicine* 7.3 (März 2001), S. 365–8. DOI: [10.1038/85520](https://doi.org/10.1038/85520) (siehe S. 5).
- [22] John McConville, Maria Elena Farrugia, David Beeson, Uday Kishore, Richard Metcalfe, John Newsom-Davis und Angela Vincent. „Detection and characterization of MuSK antibodies in seronegative myasthenia gravis.“ In: *Annals of neurology* 55.4 (Apr. 2004), S. 580–4. DOI: [10.1002/ana.20061](https://doi.org/10.1002/ana.20061) (siehe S. 5).
- [23] Kathleen Vrolix, Judith Fraussen, Peter C Molenaar, Mario Losen, Veerle Somers, Piet Stinissen, Marc H De Baets und Pilar Martínez-Martínez. „The auto-antigen repertoire in myasthenia gravis.“ In: *Autoimmunity* 43.5-6 (Aug. 2010), S. 380–400. DOI: [10.3109/08916930903518073](https://doi.org/10.3109/08916930903518073) (siehe S. 5, 6).

- [24] Osamu Higuchi, Johko Hamuro, Masakatsu Motomura und Yuji Yamanashi. „Autoantibodies to low-density lipoprotein receptor-related protein 4 in myasthenia gravis.“ In: *Annals of neurology* 69.2 (Feb. 2011), S. 418–22. DOI: [10.1002/ana.22312](https://doi.org/10.1002/ana.22312) (siehe S. 5).
- [25] Bin Zhang, John S Tzartos, Maria Belimezi, Samia Ragheb, Beverly Bealmear, Richard a Lewis, Wen-Cheng Xiong, Robert P Lisak, Socrates J Tzartos und Lin Mei. „Autoantibodies to lipoprotein-related protein 4 in patients with double-seronegative myasthenia gravis.“ In: *Archives of neurology* 69.4 (Apr. 2012), S. 445–51. DOI: [10.1001/archneurol.2011.2393](https://doi.org/10.1001/archneurol.2011.2393) (siehe S. 5).
- [26] Alexandra Pevzner, Benedikt Schoser, Katja Peters, Nicoleta-Carmen Cosma, Andromachi Karakatsani, Berthold Schalke, Arthur Melms und Stephan Kröger. „Anti-LRP4 autoantibodies in AChR- and MuSK-antibody-negative myasthenia gravis.“ In: *Journal of neurology* 259.3 (März 2012), S. 427–35. DOI: [10.1007/s00415-011-6194-7](https://doi.org/10.1007/s00415-011-6194-7) (siehe S. 5).
- [27] D B Drachman, R N Adams, L F Josifek und S G Self. „Functional activities of autoantibodies to acetylcholine receptors and the clinical severity of myasthenia gravis.“ In: *The New England journal of medicine* 307.13 (Sep. 1982), S. 769–75. DOI: [10.1056/NEJM198209233071301](https://doi.org/10.1056/NEJM198209233071301) (siehe S. 5, 74).
- [28] Tomoko Masuda, Masakatsu Motomura, Kimiaki Utsugisawa, Yuriko Nagane, Ruka Nakata, Masahiro Tokuda, Taku Fukuda, Toshiro Yoshimura, Mitsuhiro Tsujihata und Atsushi Kawakami. „Antibodies against the main immunogenic region of the acetylcholine receptor correlate with disease severity in myasthenia gravis.“ In: *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 83.9 (Sep. 2012), S. 935–40. DOI: [10.1136/jnnp-2012-302705](https://doi.org/10.1136/jnnp-2012-302705) (siehe S. 5, 10, 74).
- [29] Gil I Wolfe und Bella Gross. „Treatment review and update for myasthenia gravis.“ In: *Journal of clinical neuromuscular disease* 6.2 (Dez. 2004), S. 54–68 (siehe S. 5, 7).
- [30] R. Ahlberg, Q. Yi, R. Pirskanen, G. Matell, C. Swerup, E. P. Rieber, G Riethmüller, G. Holm und a. K. Lefvert. „Treatment of myasthenia gravis with anti-CD4 antibody: improvement correlates to decreased T-cell autoreactivity.“ In: *Neurology* 44.9 (Sep. 1994), S. 1732–7. DOI: [10.1212/WNL.44.9.1732](https://doi.org/10.1212/WNL.44.9.1732) (siehe S. 5).
- [31] Wan-Ling Hung, Yu-Hui Lin, Pao-Yu Wang und Ming-Hong Chang. „HIV-associated myasthenia gravis and impacts of HAART: one case report and a brief review.“ In: *Clinical neurology and neurosurgery* 113.8 (Okt. 2011), S. 672–4. DOI: [10.1016/j.clineuro.2011.03.019](https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2011.03.019) (siehe S. 5).
- [32] Z Y Wang, P I Karachunski, J F Howard und B M Conti-Fine. „Myasthenia in SCID mice grafted with myasthenic patient lymphocytes: role of CD4+ and CD8+ cells.“ In: *Neurology* 52.3 (Feb. 1999), S. 484–97 (siehe S. 5).
- [33] Z.-Y. Wang, D. K. Okita, J. Howard und B. M. Conti-Fine. „T-cell recognition of muscle acetylcholine receptor subunits in generalized and ocular myasthenia gravis“. In: *Neurology* 50.4 (Apr. 1998), S. 1045–1054. DOI: [10.1212/WNL.50.4.1045](https://doi.org/10.1212/WNL.50.4.1045) (siehe S. 5).
- [34] Z Y Wang, B Diethelm-Okita, D K Okita, H J Kaminski, J F Howard und B M Conti-Fine. „T cell recognition of muscle acetylcholine receptor in ocular myasthenia gravis.“ In: *Journal of neuroimmunology* 108.1-2 (Aug. 2000), S. 29–39 (siehe S. 5).

- [35] M P Protti, a a Manfredi, C Straub, J F Howard und B M Conti-Tronconi. „Immunodominant regions for T helper-cell sensitization on the human nicotinic receptor alpha subunit in myasthenia gravis.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87.19 (Okt. 1990), S. 7792–6 (siehe S. 6).
- [36] Monica Milani, Norma Ostlie, Wei Wang und Bianca M Conti-Fine. „T cells and cytokines in the pathogenesis of acquired myasthenia gravis.“ In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 998 (Sep. 2003), S. 284–307 (siehe S. 6, 10, 48, 51, 53).
- [37] Arthur Melms, G Malcherek, U Gern, H Wiethölter, C a Müller, R Schoepfer und J Lindstrom. „T cells from normal and myasthenic individuals recognize the human acetylcholine receptor: heterogeneity of antigenic sites on the alpha-subunit.“ In: *Annals of neurology* 31.3 (März 1992), S. 311–8. DOI: [10.1002/ana.410310314](https://doi.org/10.1002/ana.410310314) (siehe S. 6).
- [38] Kenneth M. Murphy, Paul Travers und Mark Walport. *Janeway Immunologie*. 7. Auflage. 2009, S. 1083 (siehe S. 6, 13, 14, 70, 75).
- [39] Paola Cavalcante, Perrine Cufi, Renato Mantegazza, Sonia Berrih-Aknin, Pia Bernasconi und Rozen Le Panse. „Etiology of myasthenia gravis: innate immunity signature in pathological thymus.“ In: *Autoimmunity reviews* 12.9 (Juli 2013), S. 863–74. DOI: [10.1016/j.autrev.2013.03.010](https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.03.010) (siehe S. 7, 11).
- [40] Alexander Marx, Frederick Pfister, Berthold Schalke, Güher Saruhan-Direskeneli, Arthur Melms und Philipp Ströbel. „The different roles of the thymus in the pathogenesis of the various myasthenia gravis subtypes.“ In: *Autoimmunity reviews* 12.9 (Juli 2013), S. 875–84. DOI: [10.1016/j.autrev.2013.03.007](https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.03.007) (siehe S. 7).
- [41] Camilla Buckley, Daniel Douek, J Newsom-Davis, Angela Vincent und Nicholas Willcox. „Mature, long-lived CD4+ and CD8+ T cells are generated by the thymoma in myasthenia gravis.“ In: *Annals of neurology* 50.1 (Juli 2001), S. 64–72 (siehe S. 7).
- [42] Ioannis Roxanis, Kingsley Micklem, John McConville, John Newsom-Davis und Nick Willcox. „Thymic myoid cells and germinal center formation in myasthenia gravis; possible roles in pathogenesis.“ In: *Journal of neuroimmunology* 125.1-2 (Apr. 2002), S. 185–97 (siehe S. 7, 75).
- [43] E Meinl, W E Klinkert und H Wekerle. „The thymus in myasthenia gravis. Changes typical for the human disease are absent in experimental autoimmune myasthenia gravis of the Lewis rat.“ In: *The American journal of pathology* 139.5 (Nov. 1991), S. 995–1008 (siehe S. 7).
- [44] S Schönbeck, F Padberg, R Hohlfeld und H Wekerle. „Transplantation of thymic autoimmune microenvironment to severe combined immunodeficiency mice. A new model of myasthenia gravis.“ In: *The Journal of clinical investigation* 90.1 (Juli 1992), S. 245–50. DOI: [10.1172/JCI115843](https://doi.org/10.1172/JCI115843) (siehe S. 7).
- [45] Nigel Unwin. „Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution.“ In: *Journal of molecular biology* 346.4 (März 2005), S. 967–89. DOI: [10.1016/j.jmb.2004.12.031](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.12.031) (siehe S. 8, 9).

- [46] K Brejc, W J van Dijk, R V Klaassen, M Schuurmans, J van Der Oost, a B Smit und T K Sixma. „Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors.“ In: *Nature* 411.6835 (Mai 2001), S. 269–76. DOI: [10.1038/35077011](https://doi.org/10.1038/35077011) (siehe S. 8).
- [47] K. Lazaridis and S. Tzartos. *Neuroscience in the 21st Century*. Hrsg. von Donald W. Pfaff. New York, NY: Springer New York, 2013. DOI: [10.1007/978-1-4614-1997-6](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1997-6) (siehe S. 9).
- [48] Cosma D Dellisanti, Yun Yao, James C Stroud, Zuo-Zhong Wang und Lin Chen. „Crystal structure of the extracellular domain of nAChR alpha1 bound to alpha-bungarotoxin at 1.94 Å resolution.“ In: *Nature neuroscience* 10.8 (Aug. 2007), S. 953–62. DOI: [10.1038/nn1942](https://doi.org/10.1038/nn1942) (siehe S. 8, 9).
- [49] JM Lindstrom. „Acetylcholine receptors and myasthenia“. In: *Muscle & nerve* April (2000), S. 453–477 (siehe S. 8, 9).
- [50] Erdem Tüzün, Windy Allman, Canan Ulusoy, Huan Yang und Premkumar Christadoss. „Novel animal models of acetylcholine receptor antibody-related myasthenia gravis.“ In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1274 (Dez. 2012), S. 133–9. DOI: [10.1111/j.1749-6632.2012.06773.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06773.x) (siehe S. 10, 11).
- [51] P Christadoss, M Poussin und C Deng. „Animal models of myasthenia gravis.“ In: *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 94.2 (Feb. 2000), S. 75–87. DOI: [10.1006/clim.1999.4807](https://doi.org/10.1006/clim.1999.4807) (siehe S. 10, 11, 75).
- [52] S J Tzartos, M E Seybold und J M Lindstrom. „Specificities of antibodies to acetylcholine receptors in sera from myasthenia gravis patients measured by monoclonal antibodies.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79.1 (Jan. 1982), S. 188–92 (siehe S. 10).
- [53] Erdem Tüzün und Premkumar Christadoss. „Complement associated pathogenic mechanisms in myasthenia gravis.“ In: *Autoimmunity reviews* 12.9 (Juli 2013), S. 904–11. DOI: [10.1016/j.autrev.2013.03.003](https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.03.003) (siehe S. 10).
- [54] Linda L Kusner und Henry J Kaminski. „The role of complement in experimental autoimmune myasthenia gravis.“ In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1274.1 (Dez. 2012), S. 127–32. DOI: [10.1111/j.1749-6632.2012.06783.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06783.x) (siehe S. 10).
- [55] Bo Wu, Elzbieta Goluszko, Ruksana Huda, Erdem Tüzün und Premkumar Christadoss. „Experimental autoimmune myasthenia gravis in the mouse.“ In: *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]* Chapter 15 (Nov. 2011), Unit 15.23. DOI: [10.1002/0471142735.im1523s95](https://doi.org/10.1002/0471142735.im1523s95) (siehe S. 11, 22, 31, 32, 45, 50).
- [56] Huan Yang, Bo Wu, Erdem Tüzün, Shamsher S Saini, Jing Li, Windy Allman, Stephen Higgs, Tian Lin Xiao und Premkumar Christadoss. „A new mouse model of autoimmune ocular myasthenia gravis.“ In: *Investigative ophthalmology & visual science* 48.11 (Nov. 2007), S. 5101–11. DOI: [10.1167/iovs.07-0271](https://doi.org/10.1167/iovs.07-0271) (siehe S. 11).
- [57] Alfons Billiau und Patrick Matthys. „Modes of action of Freund’s adjuvants in experimental models of autoimmune diseases.“ In: *Journal of leukocyte biology* 70.6 (Dez. 2001), S. 849–60 (siehe S. 11).

- [58] Shingo Nakayamada, Hayato Takahashi, Yuka Kanno und John J O'Shea. „Helper T cell diversity and plasticity.“ In: *Current opinion in immunology* 24.3 (Juni 2012), S. 297–302. DOI: [10.1016/j.coi.2012.01.014](https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.01.014) (siehe S. 13).
- [59] Shimon Sakaguchi, Kajsa Wing und Makoto Miyara. „Regulatory T cells - a brief history and perspective.“ In: *European journal of immunology* 37 Suppl 1 (Nov. 2007), S116–23. DOI: [10.1002/eji.200737593](https://doi.org/10.1002/eji.200737593) (siehe S. 13, 17, 19, 78).
- [60] Beata Zygmunt und Marc Veldhoen. *T helper cell differentiation more than just cytokines*. 1. Aufl. Bd. 109. Elsevier inc., Jan. 2011, S. 159–96. DOI: [10.1016/B978-0-12-387664-5.00005-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387664-5.00005-4) (siehe S. 13, 14, 70).
- [61] Chen Dong. „TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming.“ In: *Nature reviews. Immunology* 8.5 (Mai 2008), S. 337–48. DOI: [10.1038/nri2295](https://doi.org/10.1038/nri2295) (siehe S. 14, 15).
- [62] Stephen L Nutt und David M Tarlinton. „Germinal center B and follicular helper T cells: siblings, cousins or just good friends?“ In: *Nature immunology* 12.6 (Juni 2011), S. 472–7. DOI: [10.1038/ni.2019](https://doi.org/10.1038/ni.2019) (siehe S. 14).
- [63] Joseph E Craft. „Follicular helper T cells in immunity and systemic autoimmunity.“ In: *Nature reviews. Rheumatology* 8.6 (Juni 2012), S. 337–47. DOI: [10.1038/nrrheum.2012.58](https://doi.org/10.1038/nrrheum.2012.58) (siehe S. 14, 71).
- [64] Cecile King. „New insights into the differentiation and function of T follicular helper cells.“ In: *Nature reviews. Immunology* 9.11 (Nov. 2009), S. 757–66. DOI: [10.1038/nri2644](https://doi.org/10.1038/nri2644) (siehe S. 14).
- [65] Dario a a Vignali, Lauren W Collison und Creg J Workman. „How regulatory T cells work.“ In: *Nature reviews. Immunology* 8.7 (Juli 2008), S. 523–32. DOI: [10.1038/nri2343](https://doi.org/10.1038/nri2343) (siehe S. 14, 16, 78).
- [66] Alexander Scheffold, Kenneth M Murphy und Thomas Höfer. „Competition for cytokines: T(reg) cells take all.“ In: *Nature immunology* 8.12 (Dez. 2007), S. 1285–7. DOI: [10.1038/ni1207-1285](https://doi.org/10.1038/ni1207-1285) (siehe S. 14).
- [67] Shimon Sakaguchi, Kajsa Wing und Tomoyuki Yamaguchi. „Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg.“ In: *European journal of immunology* 39.9 (Sep. 2009), S. 2331–6. DOI: [10.1002/eji.200939688](https://doi.org/10.1002/eji.200939688) (siehe S. 14, 16).
- [68] Thomas Korn, Estelle Bettelli, Mohamed Oukka und Vijay K Kuchroo. „IL-17 and Th17 Cells.“ In: *Annual review of immunology* 27 (Jan. 2009), S. 485–517. DOI: [10.1146/annurev.immunol.021908.132710](https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132710) (siehe S. 14, 15, 17, 57, 69, 76).
- [69] Anthony Joetham, Katsuyuki Takeda, Katsuyuki Takada, Christian Taube, Nobuaki Miyahara u. a. „Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta.“ In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178.3 (Feb. 2007), S. 1433–42. DOI: [10.4049/jimmunol.178.3.1433](https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.3.1433) (siehe S. 16).

- [70] K Kai McKinstry, Tara M Strutt, Amanda Buck, Jonathan D Curtis, John P Dibble u. a. „IL-10 deficiency unleashes an influenza-specific Th17 response and enhances survival against high-dose challenge.“ In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182.12 (Juni 2009), S. 7353–63. DOI: [10.4049/jimmunol.0900657](https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900657) (siehe S. 16).
- [71] Wanda Niedbala, Xiao-Qing Wei, Beilei Cai, Axel J Hueber, Bernard P Leung, Iain B McInnes und Foo Y Liew. „IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells.“ In: *European journal of immunology* 37.11 (Nov. 2007), S. 3021–9. DOI: [10.1002/eji.200737810](https://doi.org/10.1002/eji.200737810) (siehe S. 16).
- [72] Estelle Bettelli, Thomas Korn, Mohamed Oukka und Vijay K Kuchroo. „Induction and effector functions of T(H)17 cells.“ In: *Nature* 453.7198 (Juni 2008), S. 1051–7. DOI: [10.1038/nature07036](https://doi.org/10.1038/nature07036) (siehe S. 16).
- [73] José Francisco Zambrano-Zaragoza, Enrique Jhonatan Romo-Martínez, Ma De Jesús Durán-Avelar, Noemí García-Magallanes und Norberto Vibanco-Pérez. „Th17 cells in autoimmune and infectious diseases.“ In: *International journal of inflammation* 2014.II (Jan. 2014), S. 651503. DOI: [10.1155/2014/651503](https://doi.org/10.1155/2014/651503) (siehe S. 16).
- [74] Mélissa Noack und Pierre Miossec. „Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases.“ In: *Autoimmunity reviews* 13.6 (Juni 2014), S. 668–77. DOI: [10.1016/j.autrev.2013.12.004](https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.12.004) (siehe S. 16).
- [75] Daniel Mucida, Yunji Park, Gisen Kim, Olga Turovskaya, Iain Scott, Mitchell Kronenberg und Hilde Cheroutre. „Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid.“ In: *Science (New York, N.Y.)* 317.5835 (Juli 2007), S. 256–60. DOI: [10.1126/science.1145697](https://doi.org/10.1126/science.1145697) (siehe S. 16).
- [76] Eric V Dang, Joseph Barbi, Huang-Yu Yang, Dilini Jinasena, Hong Yu u. a. „Control of T(H)17 / T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1.“ In: *Cell* 146.5 (Okt. 2011), S. 772–84. DOI: [10.1016/j.cell.2011.07.033](https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.033) (siehe S. 16, 72, 78).
- [77] Francisco J Quintana, Alexandre S Basso, Antonio H Iglesias, Thomas Korn, Mauricio F Farez, Estelle Bettelli, Mario Caccamo, Mohamed Oukka und Howard L Weiner. „Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor.“ In: *Nature* 453.7191 (Mai 2008), S. 65–71. DOI: [10.1038/nature06880](https://doi.org/10.1038/nature06880) (siehe S. 16).
- [78] William J Grossman, James W Verbsky, Benjamin L Tollefsen, Claudia Kemper, John P Atkinson und Timothy J Ley. „Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells.“ In: *Blood* 104.9 (Nov. 2004), S. 2840–8. DOI: [10.1182/blood-2004-03-0859](https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-0859) (siehe S. 16).
- [79] Xuefang Cao, Sheng F Cai, Todd a Fehniger, Jiling Song, Lynne I Collins, David R Piwnicka-Worms und Timothy J Ley. „Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance.“ In: *Immunity* 27.4 (Okt. 2007), S. 635–46. DOI: [10.1016/j.immuni.2007.08.014](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.08.014) (siehe S. 16).
- [80] Loise M Francisco, Peter T Sage und Arlene H Sharpe. „The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity.“ In: *Immunological reviews* 236 (Juli 2010), S. 219–42. DOI: [10.1111/j.1600-065X.2010.00923.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00923.x) (siehe S. 16).

- [81] Xiang-Ping Yang, Kamran Ghoreschi, Scott M Steward-Tharp, Jaime Rodriguez-Canales, Jinfang Zhu u. a. „Opposing regulation of the locus encoding IL-17 through direct, reciprocal actions of STAT3 and STAT5.“ In: *Nature immunology* 12.3 (März 2011), S. 247–54. DOI: [10.1038/ni.1995](https://doi.org/10.1038/ni.1995) (siehe S. 17, 71).
- [82] Pushpa Pandiyan, Heather R Conti, Lixin Zheng, Alanna C Peterson, Douglas R Mathern, Nydiaris Hernández-Santos, Mira Edgerton, Sarah L Gaffen und Michael J Lenardo. „CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) regulatory T cells promote Th17 cells in vitro and enhance host resistance in mouse *Candida albicans* Th17 cell infection model.“ In: *Immunity* 34.3 (März 2011), S. 422–34. DOI: [10.1016/j.immuni.2011.03.002](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.002) (siehe S. 17, 72, 78).
- [83] Yi Chen, Christopher J Haines, Ilona Gutcher, Kristin Hochweller, Wendy M Blumenschein, Terrill McClanahan, Günter Hämmerling, Ming O Li, Daniel J Cua und Mandy J McGeachy. „Foxp3(+) regulatory T cells promote T helper 17 cell development in vivo through regulation of interleukin-2.“ In: *Immunity* 34.3 (März 2011), S. 409–21. DOI: [10.1016/j.immuni.2011.02.011](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.02.011) (siehe S. 17, 72, 78, 79).
- [84] Muthusamy Thiruppathi, Julie Rowin, Qin Li Jiang, Jian Rong Sheng, Bellur S Prabhakar und Matthew N Meriggioli. „Functional defect in regulatory T cells in myasthenia gravis.“ In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1274.1 (Dez. 2012), S. 68–76. DOI: [10.1111/j.1749-6632.2012.06840.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06840.x) (siehe S. 17, 77).
- [85] Muthusamy Thiruppathi, Julie Rowin, Balaji Ganesh, Jian Rong Sheng, Bellur S Prabhakar und Matthew N Meriggioli. „Impaired regulatory function in circulating CD4(+) CD25(high) CD127(low/-) T cells in patients with myasthenia gravis.“ In: *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 145.3 (Dez. 2012), S. 209–23. DOI: [10.1016/j.clim.2012.09.012](https://doi.org/10.1016/j.clim.2012.09.012) (siehe S. 17, 77).
- [86] Andrea Fattorossi, Alessandra Battaglia, Alexia Buzzonetti, Francesca Ciaraffa, Giovanni Scambia und Amelia Evoli. „Circulating and thymic CD4 CD25 T regulatory cells in myasthenia gravis: effect of immunosuppressive treatment.“ In: *Immunology* 116.1 (Sep. 2005), S. 134–41. DOI: [10.1111/j.1365-2567.2005.02220.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02220.x) (siehe S. 17, 77).
- [87] Anna Balandina, Sandrine Lécart, Philippe Darteville, Abdelhadi Saoudi und Sonia Berrih-Aknin. „Functional defect of regulatory CD4(+)CD25+ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis.“ In: *Blood* 105.2 (Jan. 2005), S. 735–41. DOI: [10.1182/blood-2003-11-3900](https://doi.org/10.1182/blood-2003-11-3900) (siehe S. 17, 77).
- [88] Ying Zhang, Hua-bing Wang, Li-jun Chi und Wei-zhi Wang. „The role of FoxP3+ CD4+ CD25hi Tregs in the pathogenesis of myasthenia gravis.“ In: *Immunology letters* 122.1 (Jan. 2009), S. 52–7. DOI: [10.1016/j.imlet.2008.11.015](https://doi.org/10.1016/j.imlet.2008.11.015) (siehe S. 17, 77).
- [89] N Matsui, S Nakane, F Saito, I Ohigashi, Y Nakagawa u. a. „Undiminished regulatory T cells in the thymus of patients with myasthenia gravis.“ In: *Neurology* 74.10 (März 2010), S. 816–20. DOI: [10.1212/WNL.0b013e3181d31e47](https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181d31e47) (siehe S. 17, 77).
- [90] Valeria Nessi, Sara Nava, Chiara Ruocco, Chiara Toscani, Renato Mantegazza, Carlo Antozzi und Fulvio Baggi. „Naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells prevent but do not improve experimental myasthenia gravis.“ In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185.9 (Nov. 2010), S. 5656–67. DOI: [10.4049/jimmunol.0903183](https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903183) (siehe S. 17, 19, 72, 77, 78).

- [91] Revital Aricha, Tali Feferman, Sara Fuchs und Miriam C. Souroujon. „Ex vivo generated regulatory T cells modulate experimental autoimmune myasthenia gravis.“ In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 180.4 (Feb. 2008), S. 2132–9. DOI: [10.4049/jimmunol.180.4.2132](https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.4.2132) (siehe S. 17, 19, 72, 77, 78).
- [92] Caishu Deng, Elzbieta Goluszko, Erdem Tüzün, Huan Yang und Premkumar Christadoss. „Resistance to experimental autoimmune myasthenia gravis in IL-6-deficient mice is associated with reduced germinal center formation and C3 production.“ In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 169.2 (Juli 2002), S. 1077–83 (siehe S. 17, 69, 75).
- [93] Revital Aricha, Keren Mizrahi, Sara Fuchs und Miriam C Souroujon. „Blocking of IL-6 suppresses experimental autoimmune myasthenia gravis.“ In: *Journal of Autoimmunity* 36.2 (März 2011), S. 135–141. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2010.12.001> (siehe S. 18, 69, 76).
- [94] L Moiola, F Galbiati, G Martino, S Amadio, E Brambilla, G Comi, A Vincent, L M Grimaldi und L Adorini. „IL-12 is involved in the induction of experimental autoimmune myasthenia gravis, an antibody-mediated disease.“ In: *European journal of immunology* 28.8 (Aug. 1998), S. 2487–97. DOI: [10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199808\)28:08%3C2487::AID-IMMU2487%3E3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199808)28:08%3C2487::AID-IMMU2487%3E3.0.CO;2-Y) (siehe S. 18, 69).
- [95] Wei Wang, Monica Milani, Norma Ostlie, David Okita, Rajeev K Agarwal, Rachel Caspi und Bianca M Conti-fine. „C57BL/6 Mice Genetically Deficient in IL-12/IL-23 and IFN- γ Are Susceptible to Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis, Suggesting a Pathogenic Role of Non-Th1 Cells.“ In: *The Journal of Immunology* 178.11 (Juni 2007), S. 7072–7080 (siehe S. 18, 69, 70).
- [96] Lili Mu, Bo Sun, Qingfei Kong, Jinghua Wang, Guangyou Wang u. a. „Disequilibrium of T helper type 1, 2 and 17 cells and regulatory T cells during the development of experimental autoimmune myasthenia gravis.“ In: *Immunology* 128.1 Suppl (Sep. 2009), e826–36. DOI: [10.1111/j.1365-2567.2009.03089.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03089.x) (siehe S. 18).
- [97] Ying Bai, Ruolan Liu, DeRen Huang, Antonio La Cava, Yi-yuan Tang, Yoichiro Iwakura, Denise I Campagnolo, Timothy L Vollmer, Richard M Ransohoff und Fu-Dong Shi. „CCL2 recruitment of IL-6-producing CD11b+ monocytes to the draining lymph nodes during the initiation of Th17-dependent B cell-mediated autoimmunity.“ In: *European journal of immunology* 38.7 (Juli 2008), S. 1877–88. DOI: [10.1002/eji.200737973](https://doi.org/10.1002/eji.200737973) (siehe S. 18, 69, 70, 73).
- [98] Jose C Roche, Jose L Capablo, Luis Larrad, Javier Gervas-Arruga, Jose R Ara, Alejandro Sánchez und Raquel Alarcia. „Increased serum interleukin-17 levels in patients with myasthenia gravis.“ In: *Muscle & nerve* 44.2 (Aug. 2011), S. 278–80. DOI: [10.1002/mus.22070](https://doi.org/10.1002/mus.22070) (siehe S. 18).
- [99] Z Wang, W Wang, Y Chen und D Wei. „T helper type 17 cells expand in patients with myasthenia-associated thymoma.“ In: *Scandinavian journal of immunology* 76.1 (Juli 2012), S. 54–61. DOI: [10.1111/j.1365-3083.2012.02703.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2012.02703.x) (siehe S. 18, 70).
- [100] S Zheng, C Dou, N Xin, J Wang, P Li u. a. „Expression of interleukin-22 in myasthenia gravis.“ In: *Scandinavian journal of immunology* 78.1 (Juli 2013), S. 98–107. DOI: [10.1111/sji.12057](https://doi.org/10.1111/sji.12057) (siehe S. 18).

- [101] Yoichiro Iwakura, Harumichi Ishigame, Shinobu Saijo und Susumu Nakae. „Functional specialization of interleukin-17 family members.“ In: *Immunity* 34.2 (März 2011), S. 149–62. DOI: [10.1016/j.immuni.2011.02.012](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.02.012) (siehe S. 18, 69).
- [102] Donggou He, Lizhi Wu, Hee Kyung Kim, Hui Li, Craig a. Elmetts und Hui Xu. „CD8+ IL-17-producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses.“ In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 177.10 (Nov. 2006), S. 6852–8. DOI: [10.4049/jimmunol.177.10.6852](https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.6852) (siehe S. 18, 57, 72).
- [103] Sara T Passos, Jonathan S Silver, Aisling C O’Hara, David Sehy, Jason S Stumhofer und Christopher a Hunter. „IL-6 promotes NK cell production of IL-17 during toxoplasmosis.“ In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184.4 (März 2010), S. 1776–83. DOI: [10.4049/jimmunol.0901843](https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901843) (siehe S. 18, 57, 72).
- [104] Aleksandra V Rachitskaya, Anna M Hansen, Reiko Horai, Zhuqing Li, Rafael Villasmil, Dror Luger, Robert B Nussenblatt und Rachel R Caspi. „Cutting edge: NKT cells constitutively express IL-23 receptor and RORgammat and rapidly produce IL-17 upon receptor ligation in an IL-6-independent fashion.“ In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 180.8 (Apr. 2008), S. 5167–71 (siehe S. 18, 57, 72).
- [105] Caroline E Sutton, Stephen J Lalor, Cheryl M Sweeney, Corinna F Brereton, Ed C Lavelle und Kingston H G Mills. „Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity.“ In: *Immunity* 31.2 (Aug. 2009), S. 331–41. DOI: [10.1016/j.immuni.2009.08.001](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.001) (siehe S. 18, 57, 72).
- [106] Daniela A Bermejo, Shaun W Jackson, Melisa Gorosito-Serran, Eva V Acosta-Rodriguez, Maria C Amezcua-Vesely u. a. „Trypanosoma cruzi trans-sialidase initiates a program independent of the transcription factors ROR γ t and Ahr that leads to IL-17 production by activated B cells.“ In: *Nature immunology* 14.5 (Mai 2013), S. 514–22. DOI: [10.1038/ni.2569](https://doi.org/10.1038/ni.2569) (siehe S. 18, 57, 72).
- [107] M Shenoy, R Kaul, E Goluszko, C David und P Christadoss. „Effect of MHC class I and CD8 cell deficiency on experimental autoimmune myasthenia gravis pathogenesis.“ In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 153.11 (Dez. 1994), S. 5330–5 (siehe S. 19, 72).
- [108] G X Zhang, C G Ma, B G Xiao, M Bakhiet, H Link und T Olsson. „Depletion of CD8+ T cells suppresses the development of experimental autoimmune myasthenia gravis in Lewis rats.“ In: *European journal of immunology* 25.5 (Mai 1995), S. 1191–8. DOI: [10.1002/eji.1830250509](https://doi.org/10.1002/eji.1830250509) (siehe S. 19, 72).
- [109] FD Shi, HB Wang, Hulun Li und Seokmann Hong. „Natural killer cells determine the outcome of B cell-mediated autoimmunity“. In: *Nature . . .* 1.3 (2000), S. 245–251 (siehe S. 19, 72, 73).
- [110] R. Liu, L. V. Kaer, a. L. Cava, M. Price, D. I. Campagnolo, M. Collins, D. a. Young, T. L. Vollmer und F.-D. Shi. „Autoreactive T Cells Mediate NK Cell Degeneration in Autoimmune Disease“. In: *The Journal of Immunology* 176.9 (Apr. 2006), S. 5247–5254. DOI: [10.4049/jimmunol.176.9.5247](https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.9.5247) (siehe S. 19, 73).

- [111] Ruolan Liu, Antonio La Cava, Xue-Feng Bai, Youngheun Jee, Mary Price, Denise I. Campagnolo, Premkumar Christadoss, Timothy L. Vollmer, Luc Van Kaer und Fu-Dong Shi. „Cooperation of invariant NKT cells and CD4+CD25+ T regulatory cells in the prevention of autoimmune myasthenia.“ In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175.12 (Dez. 2005), S. 7898–904. DOI: [10.4049/jimmunol.175.12.7898](https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.12.7898) (siehe S. 19, 72).
- [112] H B Wang, H Li, B He, M Bakheit, M Levi, B Wahren, A Berglöf, K Sandstedt, H Link und F D Shi. „The role of B-cells in experimental myasthenia gravis in mice.“ In: *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie* 53.5-6 (Juni 1999), S. 227–33. DOI: [10.1016/S0753-3322\(99\)80093-6](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(99)80093-6) (siehe S. 19, 72).
- [113] Pierre Miossec und Jay K Kolls. „Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation.“ In: *Nature reviews. Drug discovery* 11.10 (Okt. 2012), S. 763–76. DOI: [10.1038/nrd3794](https://doi.org/10.1038/nrd3794) (siehe S. 19).
- [114] Hui-Chen Hsu, PingAr Yang, John Wang, Qi Wu, Riley Myers u. a. „Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice.“ In: *Nature immunology* 9.2 (Feb. 2008), S. 166–75. DOI: [10.1038/ni1552](https://doi.org/10.1038/ni1552) (siehe S. 19, 74, 75).
- [115] Susumu Nakae, Yutaka Komiyama, Aya Nambu, Katsuko Sudo, Michiko Iwase, Ikuo Homma, Kenji Sekikawa, Masahide Asano und Yoichiro Iwakura. „Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses.“ In: *Immunity* 17.3 (Sep. 2002), S. 375–87 (siehe S. 31, 71, 74).
- [116] Peter Mombaerts, Emiko Mizoguchi, Michael J. Grusby, Laurie H. Glimcher, Atul K. Bhan und Susumu Tonegawa. „Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice.“ In: *Cell* 75.2 (Okt. 1993), S. 275–282. DOI: [10.1016/0092-8674\(93\)80069-Q](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)80069-Q) (siehe S. 31).
- [117] Katharina Lahl, Christoph Loddenkemper, Cathy Drouin, Jennifer Freyer, Jon Arnason, Gérard Eberl, Alf Hamann, Hermann Wagner, Jochen Huehn und Tim Sparwasser. „Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease.“ In: *The Journal of experimental medicine* 204.1 (Jan. 2007), S. 57–63. DOI: [10.1084/jem.20061852](https://doi.org/10.1084/jem.20061852) (siehe S. 31, 77–79).
- [118] Janine Suffner, Kristin Hochweller, Marie-Cristine Kühnle, Xingrui Li, Richard a Kroczeck, Natalio Garbi und Günter J Hämmerling. „Dendritic cells support homeostatic expansion of Foxp3+ regulatory T cells in Foxp3.LuciDTR mice.“ In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184.4 (Feb. 2010), S. 1810–20. DOI: [10.4049/jimmunol.0902420](https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902420) (siehe S. 31, 77).
- [119] Katharina Lahl und Tim Sparwasser. „In vivo depletion of FoxP3+ Tregs using the DEREK mouse model.“ In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* Methods in Molecular Biology 707 (Jan. 2011). Hrsg. von George Kassiotis und Adrian Liston, S. 157–72. DOI: [10.1007/978-1-61737-979-6_10](https://doi.org/10.1007/978-1-61737-979-6_10) (siehe S. 31, 77, 78).
- [120] Joseph G Naglich, James E Metherall, David W Russell und Leon Eidels. „Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor.“ In: *Cell* 69.6 (Juni 1992), S. 1051–61 (siehe S. 31).

- [121] T. Mitamura, T. Umata, F. Nakano, Y. Shishido, T. Toyoda, A. Itai, H. Kimura und E. Mekada. „Structure-function analysis of the diphtheria toxin receptor toxin binding site by site-directed mutagenesis.“ In: *The Journal of biological chemistry* 272.43 (Okt. 1997), S. 27084–90. DOI: [10.1074/jbc.272.43.27084](https://doi.org/10.1074/jbc.272.43.27084) (siehe S. 31).
- [122] Matteo Bellone, Norma Ostlie, S Lei und B M Conti-Tronconi. „Experimental myasthenia gravis in congenic mice. Sequence mapping and H-2 restriction of T helper epitopes on the alpha subunits of Torpedo californica and murine acetylcholine receptors.“ In: *European journal of immunology* 21.10 (Okt. 1991), S. 2303–10. DOI: [10.1002/eji.1830211003](https://doi.org/10.1002/eji.1830211003) (siehe S. 48, 74, 77).
- [123] M Shenoy, E Goluszko und P Christadoss. „The pathogenic role of acetylcholine receptor alpha chain epitope within alpha 146-162 in the development of experimental autoimmune myasthenia gravis in C57BL6 mice.“ In: *Clinical immunology and immunopathology* 73.3 (Dez. 1994), S. 338–43 (siehe S. 48).
- [124] Marco Frentsch, Olga Arbach, Dennis Kirchhoff, Beate Moewes, Margitta Worm, Martin Rothe, Alexander Scheffold und Andreas Thiel. „Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression.“ In: *Nature medicine* 11.10 (Okt. 2005), S. 1118–24. DOI: [10.1038/nm1292](https://doi.org/10.1038/nm1292) (siehe S. 51, 53).
- [125] Angela M Thornton, Patricia E Korty, Dat Q Tran, Elizabeth a Wohlfert, Patrick E Murray, Yasmine Belkaid und Ethan M Shevach. „Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells.“ In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184.7 (Apr. 2010), S. 3433–41. DOI: [10.4049/jimmunol.0904028](https://doi.org/10.4049/jimmunol.0904028) (siehe S. 55, 71).
- [126] Harumichi Ishigame, Shigeru Kakuta, Takeshi Nagai, Motohiko Kadoki, Aya Nambu u. a. „Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoc epithelial bacterial infection and allergic responses.“ In: *Immunity* 30.1 (Jan. 2009), S. 108–19. DOI: [10.1016/j.immuni.2008.11.009](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.11.009) (siehe S. 69).
- [127] Xuexian O Yang, Seon Hee Chang, Heon Park, Roza Nurieva, Bhavin Shah u. a. „Regulation of inflammatory responses by IL-17F.“ In: *The Journal of experimental medicine* 205.5 (Mai 2008), S. 1063–75. DOI: [10.1084/jem.20071978](https://doi.org/10.1084/jem.20071978) (siehe S. 69, 71).
- [128] Rolf E Kuestner, David W Taft, Aaron Haran, Cameron S Brandt, Ty Brender u. a. „Identification of the IL-17 receptor related molecule IL-17RC as the receptor for IL-17F.“ In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 179.8 (Okt. 2007), S. 5462–73 (siehe S. 69, 70).
- [129] Thomas Korn, Meike Mitsdoerffer, Andrew L Croxford, Amit Awasthi, Valérie a Dardalhon u. a. „IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3+ regulatory T cells.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105.47 (Nov. 2008), S. 18460–5. DOI: [10.1073/pnas.0809850105](https://doi.org/10.1073/pnas.0809850105) (siehe S. 70).
- [130] Mandy J McGeachy, Kristian S Bak-Jensen, Yi Chen, Cristina M Tato, Wendy Blumenschein, Terrill McClanahan und Daniel J Cua. „TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology.“ In: *Nature immunology* 8.12 (Dez. 2007), S. 1390–7. DOI: [10.1038/ni1539](https://doi.org/10.1038/ni1539) (siehe S. 70).

- [131] A H Galy, C A Dinarello, T S Kupper, A. Kameda und J W Hadden. „Effects of cytokines on human thymic epithelial cells in culture. II. Recombinant IL 1 stimulates thymic epithelial cells to produce IL6 and GM-CSF.“ In: *Cellular immunology* 129.1 (Aug. 1990), S. 161–75. DOI: [10.1016/0008-8749\(90\)90195-W](https://doi.org/10.1016/0008-8749(90)90195-W) (siehe S. 70).
- [132] Yau-Lin Tseng, Ming-Ho Wu, Hsin-Chiao Yang, Chi-Yun Wang und Chiou-Feng Lin. „Autocrine IL-6 regulates GRO-alpha production in thymic epithelial cells.“ In: *Cytokine* 51.2 (Aug. 2010), S. 195–201. DOI: [10.1016/j.cyto.2010.05.002](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2010.05.002) (siehe S. 70).
- [133] S Cohen-Kaminsky, O Devergne, R M Delattre, I Klingel-Schmitt, D Emilie, P Galanaud und S Berrih-Aknin. „Interleukin-6 overproduction by cultured thymic epithelial cells from patients with myasthenia gravis is potentially involved in thymic hyperplasia.“ In: *European cytokine network* 4.2 (1993), S. 121–32 (siehe S. 70).
- [134] Christina E Zielinski, Federico Mele, Dominik Aschenbrenner, David Jarrossay, Francesca Ronchi, Marco Gattorno, Silvia Monticelli, Antonio Lanzavecchia und Federica Sallusto. „Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN- γ or IL-10 and are regulated by IL-1 β .“ In: *Nature* 484.7395 (Apr. 2012), S. 514–8. DOI: [10.1038/nature10957](https://doi.org/10.1038/nature10957) (siehe S. 70).
- [135] Susumu Nakae, Aya Nambu, Katsuko Sudo und Yoichiro Iwakura. „Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice.“ In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 171.11 (Dez. 2003), S. 6173–7. DOI: [10.4049/jimmunol.171.11.6173](https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.11.6173) (siehe S. 71, 74).
- [136] Susumu Nakae, Shinobu Saijo, Reiko Horai, Katsuko Sudo, Shigeo Mori und Yoichiro Iwakura. „IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100.10 (Mai 2003), S. 5986–90. DOI: [10.1073/pnas.1035999100](https://doi.org/10.1073/pnas.1035999100) (siehe S. 71).
- [137] Yutaka Komiyama, Susumu Nakae, Taizo Matsuki, Aya Nambu, Harumichi Ishigame, Shigeru Kakuta, Katsuko Sudo und Yoichiro Iwakura. „IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis.“ In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 177.1 (Juli 2006), S. 566–73 (siehe S. 71, 74).
- [138] M a Antonsyamy, W C Fanslow, F Fu, W Li, S Qian, a B Troutt und a W Thomson. „Evidence for a role of IL-17 in organ allograft rejection: IL-17 promotes the functional differentiation of dendritic cell progenitors.“ In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 162.1 (Jan. 1999), S. 577–84 (siehe S. 71).
- [139] Hong Bai, Jianjun Cheng, Xiaoling Gao, Antony George Joyee, Yijun Fan, Shuhe Wang, Lei Jiao, Zhi Yao und Xi Yang. „IL-17/Th17 promotes type 1 T cell immunity against pulmonary intracellular bacterial infection through modulating dendritic cell function.“ In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183.9 (Nov. 2009), S. 5886–95. DOI: [10.4049/jimmunol.0901584](https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901584) (siehe S. 71).
- [140] Tatiana Akimova, Ulf H Beier, Liqing Wang, Matthew H Levine und Wayne W Hancock. „Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation.“ In: *PloS one* 6.8 (Jan. 2011), e24226. DOI: [10.1371/journal.pone.0024226](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024226) (siehe S. 71).

- [141] Megan E Himmel, Katherine G MacDonald, Rosa V Garcia, Theodore S Steiner und Megan K Levings. „Helios+ and Helios- cells coexist within the natural FOXP3+ T regulatory cell subset in humans.“ In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 190.5 (März 2013), S. 2001–8. DOI: [10.4049/jimmunol.1201379](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201379) (siehe S. 71).
- [142] Estelle Bettelli, Yijun Carrier, Wenda Gao, Thomas Korn, Terry B Strom, Mohamed Oukka, Howard L Weiner und Vijay K Kuchroo. „Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells.“ In: *Nature* 441.7090 (Mai 2006), S. 235–8. DOI: [10.1038/nature04753](https://doi.org/10.1038/nature04753) (siehe S. 72, 78).
- [143] W Wu, S Shi, H-G Ljunggren, A L Cava, L Van Kaer, F-D Shi und R Liu. „NK cells inhibit T-bet-deficient, autoreactive Th17 cells.“ In: *Scandinavian journal of immunology* 76.6 (Dez. 2012), S. 559–66. DOI: [10.1111/j.1365-3083.2012.02773.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2012.02773.x) (siehe S. 73).
- [144] Junwei Hao, Ruolan Liu, Wenhua Piao, Qinghua Zhou, Timothy L Vollmer, Denise I Campagnolo, Rong Xiang, Antonio La Cava, Luc Van Kaer und Fu-Dong Shi. „Central nervous system (CNS)-resident natural killer cells suppress Th17 responses and CNS autoimmune pathology.“ In: *The Journal of experimental medicine* 207.9 (Aug. 2010), S. 1907–21. DOI: [10.1084/jem.20092749](https://doi.org/10.1084/jem.20092749) (siehe S. 73).
- [145] PW Berman und J Patrick. „Experimental myasthenia gravis. A murine system.“ In: *The Journal of experimental medicine* 40.3A (März 1980), S. 379–81 (siehe S. 74).
- [146] Meike Mitsdoerffer, Youjin Lee, Anneli Jäger, Hye-Jung Kim, Thomas Korn, Jay K Kolls, Harvey Cantor, Estelle Bettelli und Vijay K Kuchroo. „Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107.32 (Aug. 2010), S. 14292–7. DOI: [10.1073/pnas.1009234107](https://doi.org/10.1073/pnas.1009234107) (siehe S. 74, 75).
- [147] David Tarlinton. „IL-17 drives germinal center B cells?“ In: *Nature immunology* 9.2 (Feb. 2008), S. 124–6. DOI: [10.1038/ni0208-124](https://doi.org/10.1038/ni0208-124) (siehe S. 75).
- [148] Carola G Vinuesa, Michelle a Linterman, Chris C Goodnow und Katrina L Randall. „T cells and follicular dendritic cells in germinal center B-cell formation and selection.“ In: *Immunological reviews* 237.1 (Sep. 2010), S. 72–89. DOI: [10.1111/j.1600-065X.2010.00937.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00937.x) (siehe S. 75).
- [149] Ulf Klein und Riccardo Dalla-Favera. „Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy.“ In: *Nature reviews. Immunology* 8.1 (Jan. 2008), S. 22–33. DOI: [10.1038/nri2217](https://doi.org/10.1038/nri2217) (siehe S. 75).
- [150] Shutao Xie, Jun Li, John H Wang, Qi Wu, PingAr Yang, Hui-Chen Hsu, Lesley E Smythies und John D Mountz. „IL-17 activates the canonical NF-kappaB signaling pathway in autoimmune B cells of BXD2 mice to upregulate the expression of regulators of G-protein signaling 16.“ In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184.5 (März 2010), S. 2289–96. DOI: [10.4049/jimmunol.0903133](https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903133) (siehe S. 75).
- [151] James G Krueger, Scott Fretzin, Mayte Suárez-Fariñas, Patrick a Haslett, Krista M Phipps u. a. „IL-17A is essential for cell activation and inflammatory gene circuits in subjects with psoriasis.“ In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 130.1 (Juli 2012), 145–54.e9. DOI: [10.1016/j.jaci.2012.04.024](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.04.024) (siehe S. 76).

- [152] M C Genovese, F Van den Bosch, S a Roberson, S Bojin, I M Biagini, Peter Ryan und J Sloan-Lancaster. „LY2439821, a humanized anti-interleukin-17 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis: A phase I randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept study.“ In: *Arthritis and rheumatism* 62.4 (Apr. 2010), S. 929–39. DOI: [10.1002/art.27334](https://doi.org/10.1002/art.27334) (siehe S. 76).
- [153] Aarat M Patel und Larry W Moreland. „Interleukin-6 inhibition for treatment of rheumatoid arthritis: a review of tocilizumab therapy.“ In: *Drug design, development and therapy* 4 (Jan. 2010), S. 263–78. DOI: [10.2147/DDDT.S14099](https://doi.org/10.2147/DDDT.S14099) (siehe S. 76).
- [154] Ellen J Scherl, Sheila Kumar und Ryan U Warren. „Review of the safety and efficacy of ustekinumab.“ In: *Therapeutic advances in gastroenterology* 3.5 (Sep. 2010), S. 321–8. DOI: [10.1177/1756283X10374216](https://doi.org/10.1177/1756283X10374216) (siehe S. 76).
- [155] Benjamin M Segal, Cris S Constantinescu, Aparna Raychaudhuri, Lilianne Kim, Rosanne Fidelus-Gort und Lloyd H Kasper. „Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, dose-ranging study.“ In: *Lancet neurology* 7.9 (Sep. 2008), S. 796–804. DOI: [10.1016/S1474-4422\(08\)70173-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70173-X) (siehe S. 76).
- [156] Herbert P. M. Brok, Marjan van Meurs, Erwin Blezer, Allen Schantz, David Peritt, George Treacy, Jon D. Laman, Jan Bauer und Bert a. 't Hart. „Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis in common marmosets using an anti-IL-12p40 monoclonal antibody.“ In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 169.11 (Dez. 2002), S. 6554–63. DOI: [10.4049/jimmunol.169.11.6554](https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.11.6554) (siehe S. 76).
- [157] Ruolan Liu, Junwei Hao, Carlos S Dayao, Fu-Dong Shi und Denise I Campagnolo. „T-bet deficiency decreases susceptibility to experimental myasthenia gravis.“ In: *Experimental neurology* 220.2 (Dez. 2009), S. 366–73. DOI: [10.1016/j.expneurol.2009.09.022](https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.09.022) (siehe S. 76).
- [158] Vanja Lazarevic, Laurie H Glimcher und Graham M Lord. „T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity.“ In: *Nature reviews. Immunology* 13.11 (Nov. 2013), S. 777–89. DOI: [10.1038/nri3536](https://doi.org/10.1038/nri3536) (siehe S. 76).
- [159] Nathaniel S Wang, Louise J McHeyzer-Williams, Shinji L Okitsu, Thomas P Burris, Steven L Reiner und Michael G McHeyzer-Williams. „Divergent transcriptional programming of class-specific B cell memory by T-bet and ROR α .“ In: *Nature immunology* 13.6 (Juni 2012), S. 604–11. DOI: [10.1038/ni.2294](https://doi.org/10.1038/ni.2294) (siehe S. 76).
- [160] Rebekka Duhon, Simon Glatigny, Carlos a Arbelaez, Tiffany C Blair, Mohamed Oukka und Estelle Bettelli. „Cutting edge: the pathogenicity of IFN- γ -producing Th17 cells is independent of T-bet.“ In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 190.9 (Mai 2013), S. 4478–82. DOI: [10.4049/jimmunol.1203172](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203172) (siehe S. 76).
- [161] Estelle Bettelli, Brandon Sullivan, Susanne J Szabo, Raymond a Sobel, Laurie H Glimcher und Vijay K Kuchroo. „Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis.“ In: *The Journal of experimental medicine* 200.1 (Juli 2004), S. 79–87. DOI: [10.1084/jem.20031819](https://doi.org/10.1084/jem.20031819) (siehe S. 76).

-
- [162] Pedro Milanez-Almeida, Frank Klawonn, Michael Meyer-Hermann und Jochen Huehn. „Differential control of immune cell homeostasis by Foxp3(+) regulatory T cells in murine peripheral lymph nodes and spleen.“ In: *European journal of microbiology & immunology* 4.3 (Sep. 2014), S. 147–55. DOI: [10.1556/EUJMI-D-14-00022](https://doi.org/10.1556/EUJMI-D-14-00022) (siehe S. 79).
- [163] Luciana Berod, Philipp Stüve, Filipa Varela, Jochen Behrends, Maxine Swallow u. a. „Rapid rebound of the Treg compartment in DEREg mice limits the impact of Treg depletion on mycobacterial burden, but prevents autoimmunity.“ In: *PloS one* 9.7 (Jan. 2014), e102804. DOI: [10.1371/journal.pone.0102804](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102804) (siehe S. 79).
- [164] Abdul Mannan Baru, Andrea Hartl, Katharina Lahl, Jayendra Kumar Krishnaswamy, Heinz Fehrenbach, Ali O Yildirim, Holger Garn, Harald Renz, Georg M N Behrens und Tim Sparwasser. „Selective depletion of Foxp3+ Treg during sensitization phase aggravates experimental allergic airway inflammation.“ In: *European journal of immunology* 40.8 (Aug. 2010), S. 2259–66. DOI: [10.1002/eji.200939972](https://doi.org/10.1002/eji.200939972) (siehe S. 79).

Anhang

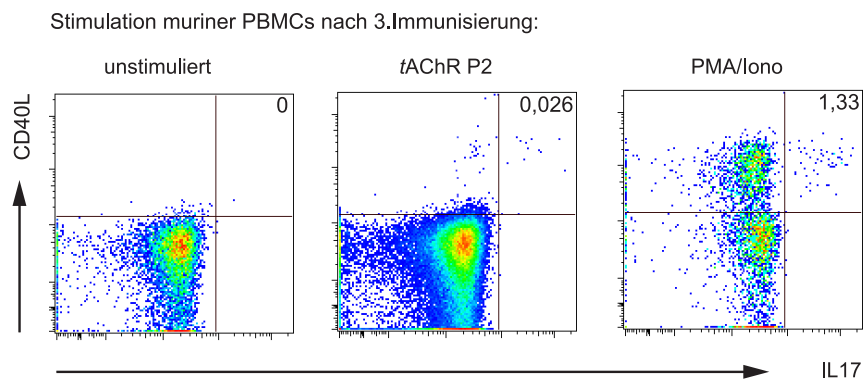


Abbildung 1: Beispiel der durchflußzytometrischen Analyse *tAChR*-spezifischer IL17⁺-produzierender CD4⁺ T-Zellen im Blut von immunisierten WT Mäusen nach der 3.Immunisierung. Die Stimulation erfolgte mit dem *tAChR*-spezifischen Peptidpool P2, als Negativkontrolle diente eine unstimulierte Probe muriner PBMCs und als Positivkontrolle PMA/Ionomycin.

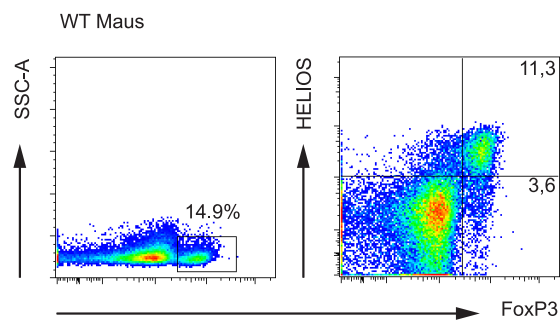


Abbildung 2: Beispiel der durchflußzytometrischen Analyse FoxP3⁺CD4⁺ T-Zellen sowie Helios⁺FoxP3⁺CD4⁺ T-Zellen aus der Milz einer immunisierten WT Maus am Versuchsendpunkt.

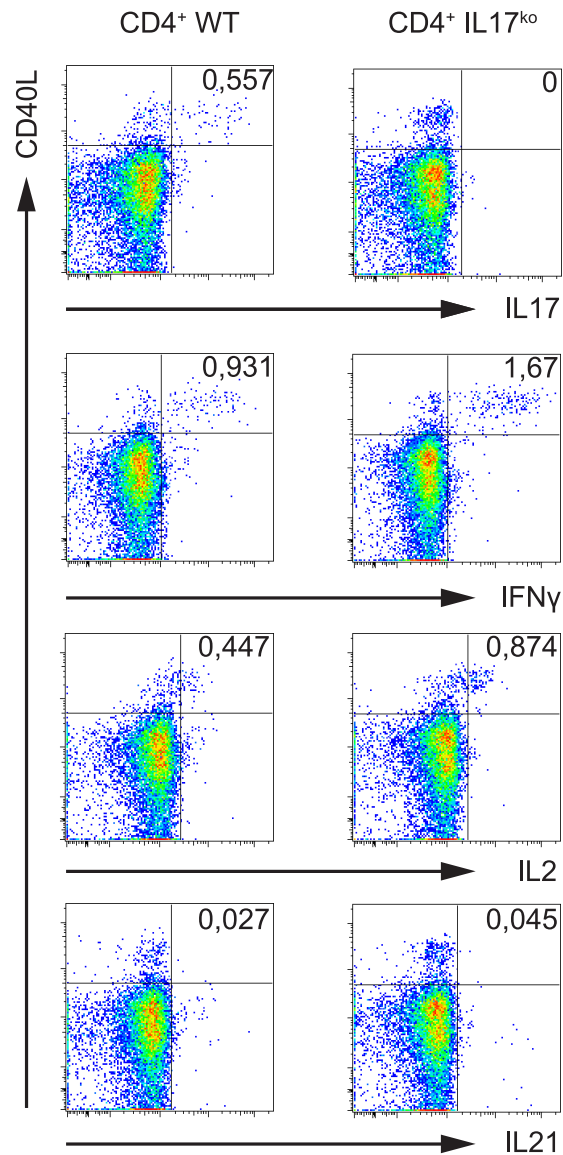


Abbildung 3: Die DotPlots zeigen die repräsentativen durchflußzytometrischen Analysen einer immunisierter, WT CD4⁺-transferierten TCR β/δ^{ko} Maus sowie einer immunisierter, IL17^{ko} CD4⁺-transferierten TCR β/δ^{ko} Maus bezüglich ihrer Zytokin-produzierenden antigenspezifisch-aktivierten CD4⁺ T-Zellen nach tAChR Peptidpool (P2) Stimulation. Die Stimulation erfolgte am Versuchsendpunkt mit Milzzellen.

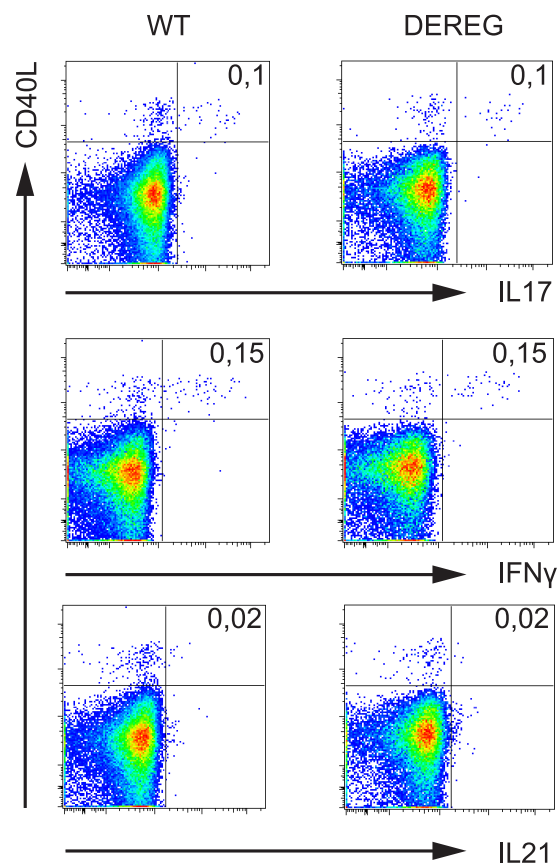


Abbildung 4: Die DotPlots zeigen die repräsentativen durchflußzytometrischen Analysen einer immunisierter, WT Maus und einer immunisierter, DEREG Maus hinsichtlich ihrer Zytokin-produzierenden antigenspezifisch-aktivierten CD4⁺ T-Zellen nach *tAChR* Peptidpool (P2) Stimulation. Die Stimulation erfolgte am Versuchsendpunkt mit Zellen der Milz.

Peptid Nr.	Amminosäuresequenzen
	Peptidppol P1
163	DITVGLQLIQLISVD
164	GLQLIQLISVDEVNQ
165	IQLISVDEVNQIV
166	VWLPLDLVLYNNADGD
167	DLVLYNNADGDFAIV
168	YNNADGDFAIVHMTK
169	DGDFAIVHMTKLLLD
170	AIVHMTKLLLDYTGK
171	MTKLLLDYTGKIMWT
172	LLDYTGKIMWTPPAI
	Peptidppol P3
183	VYYTCCPDTPYLDIT
184	CCPDTPYLDITYHFI
185	TPYLDITYHFIMQRI
186	DITYHFIMQRIPLYF
187	HFIMQRIPLYFVVNV
188	QRIPLYFVVNVIIPC
189	LYFVVNVIIPCCLFS
190	VNVIIPCCLFSFLTG
191	IPCCLFSFLTGLVIFY
192	LFSFLTGLVIFYL
	Peptidppol P4
193	VFLLVIVELIPSTSS
194	VIVELIPSTSSAVPL
195	LIPSTSSAVPLIGKY
196	TSSAVPLIGKYMLFT
197	VPLIGKYMLFTMIFV
198	GKYMLFTMIFVISSI
199	LFTMIFVISSIIITV
200	IFVISSIIITVVVIN
201	SSIIITVVVINTHHR
202	ITVVVINTHHRSPST
	Peptidppol P5
203	VINTHHRSPSTHTMP
204	HHRSPSTHTMPQWVR
205	PSTHTMPQWVRKIFI
206	TMPQWVRKIFIDTIP
207	WVRKIFIDTIPNVMF
208	IFIDTIPNVMF
209	VIFQTPLIKNPDVKS
210	TPLIKNPDVKSAIEG
211	KNPDVKSAIEGVK

Tabelle 1: tAChR-spezifische Peptidpoole P1, P3, P4, P5.

Peptid Nr.	Amminosäuresequenzen
	Peptidppol P1
114	QVTVGLQLIQLINVD
115	GLQLIQLINVDEVNQ
116	IQLINVDEVNQIV
117	IWRPDVVLYNNADGD
118	DVVLYNNADGDFAIV
119	YNNADGDFAIVKFTK
120	DGDFAIVKFTKVLLD
121	AIVKFTKVLLDYTGH
122	FTKVLLDYTGHITWT
123	LLDYTGHITWTTPAI
	Peptidppol P2
124	TGHITWTTPAIFKSY
125	TWTTPAIFKSYCEI
126	QNCMKLGTWTYDGS
127	MKLGTWTYDGSVVAI
128	TWTYDGSVVAINPES
129	DGSVVAINPESDQPD
130	VAINPESDQPDLSNF
131	PESDQPDLSNF
132	EARGWKHWVFYSCCP
133	WKHWVFYSCCPTTPY
	Peptidppol P3
134	VFYSCCPTTPYLDIT
135	CCPTTPYLDITYHFV
136	TPYLDITYHFVMQRL
137	DITYHFVMQRLPLYF
138	HFVMQRLPLYFIVNV
139	QRLPLYFIVNVIIPC
140	LYFIVNVIIPCLLFS
141	VNVIIPCLLFSFLTS
142	IPCLLFSFLTSLVFY
143	LFSFLTSLVFYL

Tabelle 2: mAChR-spezifische Peptidpoole P1 - P3.

Peptid Nr.	Amminosäuresequenzen
	Peptidppol P4
144	VFLLVIVELIPSTSS
145	VIVELIPSTSSAVPL
146	LIPSTSSAVPLIGKY
147	TSSAVPLIGKYMLFT
148	VPLIGKYMLFTMVFV
149	GKYMLFTMVFVIASI
150	LFTMVFVIASIIITV
151	VFVIASIIITVIVIN
152	ASIIITVIVINTHHR
153	ITVIVINTHHRSPST
	Peptidppol P5
154	VINTHHRSPSTHIMP
155	HHRSPSTHIMPEWVR
156	PSTHIMPEWVRKVFI
157	IMPEWVRKVFIDTIP
158	WVRKVFIDTIPNIMF
159	VFIDTIPNIMF
160	MGFHSPLIKHPEVKS
161	SPLIKHPEVKSAIEG
162	KHPEVKSAIEGVK

Tabelle 3: mAChR-spezifische Peptidpoole P4 - P5.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Berlin-Brandenburger Centrum für Regenerative Therapien (BCRT) und in der Experimentellen Neurologie an der Charité Berlin. An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Bei Prof. Dr. Andreas Thiel möchte ich mich für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe am Berlin-Brandenburger Centrum für Regenerative Therapien (BCRT) und für die Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Prof. Dr. Andreas Meisel möchte ich für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe der Experimentellen Neurologie danken, wodurch ich neben der Immunologie auch einen Einblick in die neurologische Forschung erhielt.

Herrn Prof. Dr. Andreas Radbruch möchte ich für die Bereitschaft danken, meine Arbeit als Doktorvater zu begleiten.

Ein ganz großes Dankeschön geht an Dr. Siegfried Kohler für die Betreuung und die kritische Durchsicht meiner Doktorarbeit. Vielen Dank für die wertvollen Anregungen, Ratschläge, fachlichen Diskussionen und die Motivation während dieser Zeit. Alles zusammen hat sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Thiel möchte ich mich herzlich für die nette Atmosphäre rund um die Freitag-nachmittags-Besprechungen danken und für das Shutteln diverser Bestellungen zwischen dem CVK und CCM.

Außerdem möchte ich mich bei den Mitgliedern der Experimentellen Neurologie für das gute Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft bedanken. Mein besonderer Dank gilt dabei den ehemaligen und aktuellen Mitglieder der Arbeitsgruppe Meisel für die vielen netten Stunden im Labor, den Kaffee zwischendurch und die Freundschaft, die mich mit einigen von Euch verbindet.

Abschließend möchte ich meiner Familie von Herzen für die jahrelange Unterstützung, die vielen guten Ratschläge und das Interesse an meiner Arbeit danken.

Publikationen

- [1] H. Schaffert, A. Pelz, A. Saxena, M. Losen, A. Meisel, A. Thiel, S. Kohler. „IL-17-producing CD4+ T cells contribute to the loss of B-cell tolerance in experimental autoimmune myasthenia gravis“. In: *European Journal of Immunology* (2015), n/a–n/a. DOI: [10.1002/eji.201445064](https://doi.org/10.1002/eji.201445064).
- [2] A. Taddeo, V. Gerl, B. F. Hoyer, H.-D. Chang, S. Kohler, H. Schaffert, A. Thiel, A. Radbruch, F. Hiepe. „Selection and depletion of plasma cells based on the specificity of the secreted antibody.“ In: *European journal of immunology* (Sep. 2014), S. 1–3. DOI: [10.1002/eji.201444993](https://doi.org/10.1002/eji.201444993).
- [3] S. Kohler, T. O. P. Keil, M. Swierzy, S. Hoffmann, H. Schaffert, M. Ismail, J. C. Rückert, T. Alexander, F. Hiepe, C. Gross, A. Thiel, A. Meisel. „Disturbed B cell subpopulations and increased plasma cells in myasthenia gravis patients.“ In: *Journal of neuroimmunology* 264.1-2 (Nov. 2013), S. 114–9. DOI: [10.1016/j.jneuroim.2013.09.006](https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.09.006).
- [4] S. Bunk, H. Schaffert, B. Schmid, C. Goletz, S. Zeller, M. Borisova, F. Kern, J. Rupp, C. Hermann. „Chlamydia pneumoniae-induced memory CD4+ T-cell activation in human peripheral blood correlates with distinct antibody response patterns.“ In: *Clinical and vaccine immunology : CVI* 17.5 (Mai 2010), S. 705–12. DOI: [10.1128/CVI.00209-09](https://doi.org/10.1128/CVI.00209-09).

Selbstständigkeitserklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Berlin, den 06.01.2015

Hanne Schaffert